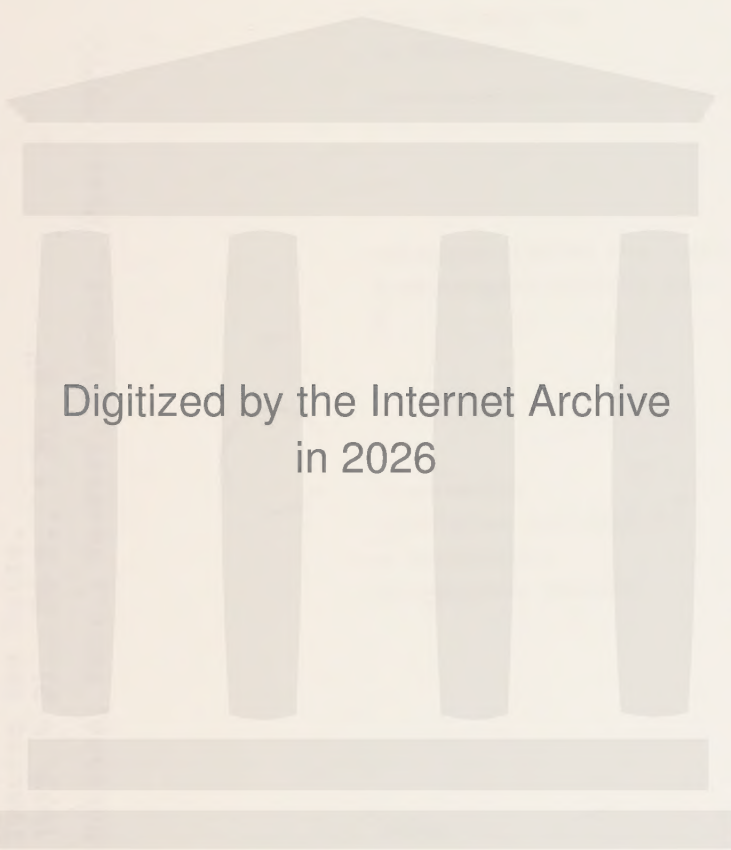


**ETABLIERUNG UND PARTIELLE
CHARAKTERISIERUNG VON
LANGZEITKULTUREN
EXPERIMENTELLER NEUROGENER TUMOREN
DER RATTE**

Ursula Osterkamp

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555625_0003

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
(Prof. Dr. E. Dahme)
am Institut für Tierpathologie der Universität München
Angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. D. Stavrou

ETABLIERUNG UND PARTIELLE CHARAKTERISIERUNG VON LANG-
ZEITKULTUREN EXPERIMENTELLER NEUROGENER TUMOREN DER
RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ursula Osterkamp
aus München

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Priv.-Doz. Dr. D. Stavrou
Korreferent: Prof. Dr. P.A. Bachmann

Tag der Promotion: 29. Juli 1977



MEINEN LIEBEN ELTERN

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. LITERATURÜBERSICHT	
1. Induktion experimenteller neurogener Tumoren	3
2. In vitro-Züchtung neurogener Tumoren	4
3. S-100-Protein	9
4. Concanavalin A	10
C. PROBLEMATIK	13
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
1. Material und Methodik	
1.1. Tierversuche	15
1.2. Histologische Untersuchung	16
1.3. Elektronenmikroskopische Untersuchung	17
1.4. Gewebekultur	
a) Tumorzellkulturen	18
b) Gliazellkulturen	18
1.4.1. Subkulturen	19
1.4.2. Konservierung und Lagerung der Zellen	19
1.4.3. Klonierung	20
1.4.4. Chromosomendarstellung	22
1.5. Immunologische Untersuchungen	
1.5.1. Immunofluoreszenz	
a) Zytologischer Nachweis des S-100-Proteins	25
b) Nachweis humoraler Antikörper im autologen System	26
1.5.2. Mikrozytotoxizitäts-Test	26

1.6. Nachweis von Concanavalin A-Rezeptoren an der Zellmembran von Glia- und Gliomzellen	
1.6.1. Agglutinationstest	28
1.6.2. Zytochemische Darstellung	29
2. Ergebnisse	
2.1. Tumorinduktion	30
2.2. Lichtmikroskopische Befunde	
2.2.1. Primärtumoren	
a) Pleomorphe Gliome	32
b) Pleomorphe Neurinome	32
2.2.2. Langzeitkulturen	
a) Pleomorphe Gliome	34
b) Pleomorphe Neurinome	37
2.2.3. Transplantationstumoren	39
2.3. Elektronenmikroskopische Befunde	
2.3.1. Primärtumoren	
a) Pleomorphe Gliome	40
b) Pleomorphe Neurinome	42
2.3.2. Langzeitkulturen	
a) Pleomorphe Gliome	43
b) Pleomorphe Neurinome	43
2.3.3. Transplantationstumoren	45
2.4. Chromosomenanalyse	45
2.5. Immunologische Untersuchungen	
a) S-100-Protein (Immunofluoreszenz)	46
b) Autologe fluoreszierende Antikörper (Immunofluoreszenz)	47
c) Autologe zytotoxische Antikörper (Mikrozytotoxizitätstest)	49

	Seite
2.6. Nachweis Con A-bindender Rezeptoren	
a) Agglutinationstest	49
b) Zytochemische Darstellung	50
E. DISKUSSION	
1. Zur Natur experimentell induzierter Tumoren	53
2. Isolierung und Etablierung homologer Tumorzelllinien unter Verwendung von conditioniertem Medium	55
3. Elektronenmikroskopische Befunde bei Primär- bzw. Transplantationstumoren sowie bei den entsprechenden Zell- kulturen	57
4. Zytogenetische Befunde	59
5. Concanavalin A - bindende Rezeptoren	59
6. Immunologische Befunde	61
F. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	65
G. LITERATURVERZEICHNIS	69

A. EINLEITUNG

Spontan auftretende Tumoren des Nervensystems sind bei Mensch und Tier im Gegensatz zu Geschwülsten anderer Organsysteme selten und lassen Untersuchungen nur in beschränktem Umfang zu. Durch die Anwendung bestimmter Resorptivkanzerogene mit neurotroper Wirkung können bei Versuchstieren regelmäßig und selektiv Tumoren induziert werden. Diese experimentellen Geschwülste sind adäquate Modellsysteme für neurogene Spontantumoren und erlauben eine gezielte Untersuchung spezieller neuroonkologischer Fragen.

Da zellbiologische Studien an induzierten Neoplasien des Nervensystems wegen ihrer Heterogenität und ihrer starken Entdifferenzierung nicht nur schwierig, sondern nahezu unmöglich sind, erschien es notwendig, neben der histomorphologischen Analyse weitere Methoden zu ihrer Charakterisierung heranzuziehen. So eignet sich die Verwendung von Zellkulturen in der Onkologie zur Aufklärung der zytologischen Zusammensetzung von Tumoren und bietet darüberhinaus die Möglichkeit, neue Erkenntnisse auf den Gebieten der Ätiologie, Formalpathogenese, Diagnose und Therapie zu gewinnen. Die in vitro-Kultivation von Tumoren des Nervensystems hat sich für die experimentelle Neuroonkologie bereits als entscheidender Fortschritt erwiesen.

Die ersten Versuche, normales und neoplastisches Gewebe des ZNS unter geeigneten Bedingungen am "Leben" zu erhalten, wurden schon zu Beginn dieses Jahrhunderts durchgeführt. Im Jahre 1908 beschrieb HARRISON die Explantation isolierten Nervengewebes von Froschembryonen auf koagulierte Froschlymphe und beobachtete das Aussproßen markloser Nervenfasern. Die Gewebe-

züchtung maligner glialer Tumoren wurde 1925 von FISCHER erprobt. Ihm gelang es, Kulturen über zwei Monate in vitro zu erhalten. Weitere Arbeiten über die Kultivierung von primär intrakranialen Tumoren finden sich bei KREDEL (1928) und BUCKLEY (1929).

Die Einführung der Trypsinierungstechnik (MOSCONA und MOSCONA, 1952) hat es ermöglicht, aus Explantatkulturen Zellkulturen und schließlich Einschicht- oder "Mono-layer"-Kulturen zu entwickeln.

Die methodische Entwicklung auf dem Gebiet der Zellbiologie war eine notwendige Voraussetzung für eine systematische Kultivierung von Hirngeschwülsten (KERSTING, 1961). Langzeitkulturen experimenteller NS-Tumoren sind als Modelle und Testsysteme für eine Vielzahl neuro-onkologischer und neurophysiologischer Fragestellungen heute unentbehrlich. Überdies können durch die Anwendung von Zellkulturen Experimente an Versuchstieren auf ein Minimum reduziert werden.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. Induktion experimenteller neurogener Tumoren

Einen entscheidenden Aufschwung erfuhr die experimentelle Neuroonkologie durch die erfolgreiche Anwendung von Resorptionskanzerogenen mit auffallend neurotroper Wirkung (DRUCKREY et al. 1964, 1967). Die ausgeprägte Organotropie zum Zentralnervensystem (ZNS) wurde vor allem bei einigen Verbindungen aus der Stoffgruppe der Nitrosamide gefunden. Ein hochwirksamer Vertreter der genannten Stoffklasse ist N-Methyl-N-nitrosoharnstoff (MNH). Durch Langzeitverabreichung von MNH können mit überraschender Regelmäßigkeit selektiv im Nervensystem (NS) maligne Tumoren erzeugt werden. Die induzierten Tumoren sind bevorzugt in Hirn, aber auch Rückenmark, und im peripheren Nervensystem (PNS) lokalisiert.

Die pharmakologischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften des MNH sowie sein Wirkungsmechanismus sind von DRUCKREY et al. (1965) in einer grundlegenden Arbeit beschrieben worden.

In der Folgezeit wurden von einer Reihe von Autoren die verschiedensten Applikationsformen des resorptiv wirkenden Karzinogens erprobt (THOMAS et al. 1967; STAVROU 1970; JÄNISCH et al. 1970).

Die Morphologie der Tumoren und ihre Klassifizierbarkeit nach histologischen Merkmalen bzw. ihre Einteilung entsprechend ihrem Malignitätsgrad wurden in einer Vielzahl von Untersuchungen bereits hinreichend erörtert (THOMAS und KERSTING, 1964; IVANKOVIC 1967; STAVROU 1970, 1971; STAVROU und HAGLID, 1973).

Von besonderem Interesse für die vergleichende Neuro-pathologie ist der Nachweis, daß die durch MNH induzierten Geschwülste sowohl morphologisch (JÄNISCH und SCHREIBER, 1969; WECHSLER et al. 1969; STAVROU 1971) als auch enzymhistochemisch (STAVROU und DAHME, 1969; STAVROU 1969, 1971) mit den spontan auftretenden neurogenen Tumoren bei Mensch und Tier vergleichbar sind.

2. In vitro-Züchtung neurogener Tumoren

Die Gewebezüchtung neurogener Tumoren wurde von einer Vielzahl von Autoren beschrieben. Bei der Überwiegenden Mehrzahl der vorhandenen Arbeiten handelt es sich um Beobachtungen sogenannter "Kurzzeitkulturen". Eine systematische Kultivierung von menschlichen Hirngeschwülsten über einen längeren Zeitraum wurde von KERSTING (1961) mit Erfolg durchgeführt. KERSTING hat in seiner grundlegenden Arbeit "Die Gewebezüchtung menschlicher Hirngeschwülste" das morphologische Verhalten intrakranialer Tumoren in vitro beschrieben und eine einfache und erfolgreiche Kultivierungstechnik demonstriert. Er explantierte zerkleinerte Tumorstückchen auf Deckgläser und erzielte in etwa 90% der Explantationsansätze positive Resultate. Seine Kultivierung bestimmter Gliomformen widerlegte die bislang in der Literatur beschriebene schwierige Züchtbarkeit dieser Tumoren.

MANUELIDIS (1965) wandte die gleiche Kultivierungsmethode an. Von 77 in Kultur genommenen menschlichen Glioblastomen überlebten 29. Die längste Überlebensdauer einer Gliomkultur betrug 2839 Tage. Seine Erfahrungen lehren, daß die Zahl ausgesäter Tumorfragmente pro Kulturflasche genügend groß sein muß, um einen ausgeglich-

nen Metabolismus der einzelnen Gewebestückchen zu garantieren, d.h. um Kulturen erfolgreich etablieren zu können. Sie lehren ferner, daß eine Subkultivierung erst bei vollständiger Konfluation der Zellen durchgeführt werden sollte.

Die von KERSTING und MANUELIDIS beschriebene Explantat-Technik wurde auch von BENDA et al. (1968) zur Kultivierung MNH-induzierter neurogener Tumoren benutzt. Die Verwendung dieser Zellkulturen war zunächst nicht zur Etablierung von Langzeitkulturen gedacht. Seine Versuche, experimentell induzierte Primärtumoren im syngenen System zu transplantieren, waren nur zum Teil erfolgreich. Wenn er dagegen kultivierte Tumorzellen neugeborenen Ratten inokuliert hatte, konnte er eine größere Ausbeute an Transplantationstumoren erzielen.

In der Folgezeit wurde eine Vielzahl von experimentellen neurogenen Tumoren mittels dieser Technik kultiviert. SCHMIDEK et al. (1971) konnten gliale Tumoren bei Ratten durch i.v. Applikation von MNH induzieren und von 22 Primärtumoren 11 Geschwülste in Kultur nehmen. Nach mehreren in vitro-in vivo Passagen der Tumorzellen entwickelten sich permanente, stabile Zelllinien von Astrozytomen verschiedener Differenzierungsstufen. Experimentelle NS-Tumoren unterschiedlicher Provenienz wurden von THUST et al. (1971) kultiviert und morphologisch analysiert.

Neben primären Hirntumoren können durch orale Verabreichung von Resorptivkanzerogenen auch Geschwülste des peripheren Nervensystems erzeugt werden. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß es sich meist um maligne Schwannome handelt (STAVROU, 1969; GEORGSSON et al. 1969; CRAVIOTO und LOCKWOOD, 1969).

Das Verhalten experimenteller Neurinome in vitro wurde von CRAVIOTO et al. (1972) in einer umfassenden Studie beschrieben. Ziel der Untersuchungen war der Vergleich dieser bei Ratten induzierten Tumoren mit menschlichen Neurinomen. Bei isologen Tieren (BD-IX-Ratten) konnten durch subkutane Injektion von 10^4 Zellen der kultivierten Geschwülste Transplantationstumoren erzeugt werden, die in ihren histologischen und ultrastrukturellen Merkmalen den Originaltumoren glichen. Ähnliche Untersuchungen wurden auch von FORNATO und SCHIFFER (1972) und PFEIFFER und WECHSLER (1972) durchgeführt.

BENDA et al. (1968, 1971) konnten durch alternierende in vitro-in vivo Passagen fünf morphologisch unterschiedliche Zelllinien aus induzierten Hirntumoren etablieren. Nur drei Zelllinien (C_6 , $C-2_1$, $C-2_2$) führten, rücktransplantiert auf Ratten, zu Tumorstadium. Solche Sekundärtumoren waren mitosereich, und vielkernige Riesenzellen traten häufig auf.

Die Möglichkeit, aus differenzierten, transplantierbaren Tumoren bzw. aus den Zellkulturen dieser Geschwülste Zelllinien zu gewinnen, wurde auch von PFEIFFER und WECHSLER (1972) beschrieben. Sie isolierten 4 Zelllinien aus ÄNH-induzierten Wurzelneurinomen, die in vitro ein nahezu einheitliches Wachstum zeigten. Erst nach der s.c. Injektion von Zellsuspensionen dieser Linien in syngene Ratten ließen sich Transplantationstumoren erzeugen, die hinsichtlich ihrer Morphologie histologisch größere Unterschiede aufwiesen. Die Zelllinie, bei der das gliaspezifische S-100 Protein nachzuweisen war, wurde als neoplastisches Schwannom klassifiziert, während die übrigen Linien auf Grund ihrer großen Produktion von Retikulin- und Kollagenfasern in vivo als mesodermale Neoplasmen bezeichnet wurden. Der Vergleich der

Zelllinien zeigt, daß aus heterogenen Zellpopulationen Einzelzellen isoliert werden können, die morphologisch und zytogenetisch verschieden sind. Mit der Klonierungstechnik wurde die selbständige Lebensfähigkeit bzw. Autonomie einer Einzelzelle bewiesen (MAYR et al. 1974).

Hirntumoren des Menschen zeigen je nach Tumortyp ein spezifisches Verhalten in der Zellkultur (KERSTING, 1961). Für experimentell induzierte Geschwülste des gleichen Typs konnten inzwischen analoge Befunde erhoben werden (THUST, 1976).

Von verschiedenen Autoren wurde nachgewiesen, daß experimentell induzierte Neoplasien des ZNS in ihren in vitro-Eigenschaften den menschlichen Tumoren vergleichbar sind. Das zytologische Einteilungsschema von BAILEY und CUSHING (1926), modifiziert nach ZÜLCH (1956) ist auch für die Gewebekulturen experimenteller NS-Tumoren verwendbar. Die in situ vorhandenen "individuellen" Einflüsse fehlen unter den standardisierten Bedingungen der Kultur und das Bild der Zellen und Zellverbände erscheint einheitlicher als die entsprechenden Schnittpräparate (KERSTING, 1961; LUMSDEN, 1963). Vor allem bei den im Schnittpräparat oft unklaren Blastomen ist dies von praktisch-diagnostischer Bedeutung. Der Versuch, Kulturen zur Klassifikation von Glioblastomzellen auf Grund morphologischer Befunde heranzuziehen, wurde bereits von PINKUS (1935) unternommen. Zellkulturen sind zur Verwendung als Klassifikationskriterium insofern geeignet, da sich unter Anwendung der Explantatechnik das gesamte Spektrum der in der Geschwulst vorhandenen Zellformen widerspiegelt. Unerläßlich bleibt jedoch der Vergleich zwischen den an kultivierten Tumoren und den histopathologisch erhobenen Befunden (SANO et al. 1961).

In der Krebsforschung wird die Züchtung von Tumorzellen in vitro nicht nur zur Klärung zytologischer Fragen verwendet, sondern auch in der Tumordiagnostik eingesetzt. Ferner dürfte zukünftig die Prüfung des Verhaltens von Tumorzellen im Kurzzeitkultur-System gegenüber verschiedenen Zytostatika (Zytostatobiogramm) zur Entwicklung eines individuellen Chemotherapiekonzepts von wesentlicher Bedeutung sein.

Für viele biochemische und immunologische Untersuchungen bietet die Kultivierung von Tumorzellen wesentliche Vorteile. Mit Hilfe dieser Technik können, zeitlich unbegrenzt, weit größere Zellmengen produziert werden als sie je aus dem Ursprungsmaterial zu gewinnen wären. Kultivierte Zellen werden zum Studium der Autoimmunität, der Histokompatibilität und der Zytotoxizität eingesetzt. Die Methode zum Nachweis der in vitro-Zerstörung von "Target" (Ziel) - Zellen durch humorale Antikörper auto- loger Seren bietet gute Voraussetzungen für die Analyse immunologischer Beziehungen zwischen Tumor und Wirts- organismus (PEES, 1975).

Mechanisch isolierte Tumorzellen aus Primärgeschwülsten können von "blockierenden" Faktoren abgedeckt sein und eine spezifische Zytolyse durch sensibilisierte Lympho- zyten oder zirkulierende humorale Antikörper somit blockieren. Tumorzellen, die kultiviert wurden, sind nach mindestens einer oder mehreren Passagen frei von "blockierenden" Faktoren (SJÖRGEN et al. 1972).

Mit der Klonierung glialer Kulturen konnten neue Er- kenntnisse über neurophysiologische Vorgänge und die spezifischen Leistungen von Einzelzellen gewonnen wer- den. So ist SCHUBERT et al. (1974) der Nachweis gelungen, daß Gliazellen zur Synthese von Neurotransmittern, wie

Acetylcholintransferase und Tyrosinhydroxylase, fähig sind. Transplantationstumoren von Zelllinien wurden auch zur prätherapeutischen Testung von Radioisotopen ($^{65}\text{ZnCl}_2$) verwendet, um die Verteilung dieser Substanzen zu untersuchen (BENDA et al. 1971).

3. S-100 Protein

In den letzten Jahren wurde dem Studium spezifischer Proteine des Nervensystems besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Große Bedeutung kommt dem gliaspezifischen S-100 Protein zu. Dieses Protein wurde von MOORE und MCGREGOR (1965) bei elektrophoretischen Untersuchungen entdeckt, isoliert und charakterisiert. Das sehr saure Protein ist in 100%igem Ammoniumsulfat bei einem neutralen pH-Wert löslich und wurde deshalb von MOORE (1965) "S-100 Protein" benannt. Angaben über das Molekulargewicht variieren zwischen 19 500 und 24 000 (MOORE, 1969; STEWART, 1972).

In der modernen Neuropathologie nehmen hirnspezifische Proteine als zelluläre Charakteristika für den histogenetischen Ursprung von Tumorzellen eine wichtige Rolle ein. Das S-100 Protein wurde in menschlichen Spongioblastomen, Astrozytomen und Glioblastomen (BENDA, 1968; HAGLID et al. 1970; HAGLID und CARLSSON, 1971) sowie in experimentellen neurogenen Tumoren der Ratte (Astrozytome, Oligodendrogliome, polymorphe Gliome und Neurinome) nachgewiesen (BENDA et al. 1968; STAVROU et al. 1971; STAVROU und HAGLID, 1973; STAVROU et al. 1974). Die bislang vorliegenden Untersuchungen wurden mit Hilfe der Immundiffusion, der Komplementbindungsreaktion und der Polyacrylamid-Elektrophorese oder der Immunofluoreszenz-Technik an Gefrierschnitten und Gewebekulturpräparaten durchgeführt.

Bei den Nitrosamid induzierten Tumoren handelt es sich größtenteils um anaplastische Formen, die morphologisch schwer zu charakterisieren sind. Der immunohistochemische Nachweis des S-100 Proteins läßt auf einen neuroektodermalen Ursprung dieser Tumoren bzw. auf das Vorhandensein glialer Strukturen in diesen schließen. In Gewebekulturen dient das Auftreten des Proteins als Kontrolle der Eigenschaften etablierter Kulturen aus neurogenen Tumoren und kann dadurch die Frage nach dem erhalten gebliebenen glialen Charakter, trotz wiederholter Subkultivierungen, hinreichend beantwortet werden.

Sowohl Glia- als auch Gliomzellen können das S-100 Protein synthetisieren. Die an Zellkulturen erhobenen Befunde zeigen, daß der Gehalt des Proteins mit zunehmender Zelldichte um die 10-fache Konzentration steigt, in der stationären Phase der Kulturen - bei 100%iger Konfluation der Zellen - am höchsten ist und dann konstant bleibt (BENDA et al. 1968; PFEIFFER et al. 1970). Untersuchungen an menschlichen Glioblastomen und MNH-induzierten Gliomen der Ratte zeigen, daß mit zunehmender Entdifferenzierung der Zellen der Gehalt des wasserlöslichen S-100 Proteins/mg löslichen Proteins abnimmt (STAVROU et al. 1973).

4. Concanavalin A

Concanavalin A (Con A) gehört zu einer Gruppe von pflanzlichen Proteinen, die als Lektine bekannt sind. Sie haben die Eigenschaft, sich spezifisch an verschiedenen Kohlenhydratanteilen der Zelloberflächenmembran tierischer und menschlicher Zellen anzulagern und diese zur Agglutination zu bringen. Zu den bekanntesten Lektinen gehören

das "wheat germ agglutinin" (WGA), ein aus Weizenkeimen gewonnenes Glykoprotein, und das Con A, ein Globulin aus *Canavalia ensiformis* (Jack-Bohnen) (EDELMANN et al. 1972). Letzteres reagiert spezifisch mit terminalen Glukose- oder Mannose-Gruppen, wie den α -D-Mannopyranosyl- und Glukopyranosyl-Resten und sterisch ähnlichen Resten von Polysaccharidketten der Zelloberfläche normaler und transformierter Zellen (BURGER, 1973). Lektine ermöglichen eine Unterscheidung zwischen normalen und Tumorzellen (NICOLSON, 1971), zwischen embryonalen und ausgereiften Zellen (MOSCONA, 1971) und zwischen Zellen, die sich in Mitose oder Interphase befinden (HALLE, 1976).

Eine Vielzahl von biochemischen und immunologischen Techniken wurde entwickelt, um chemische Zelloberflächenalterationen zu erfassen, die mit der Transformation einhergehen. Eine in letzter Zeit sehr häufig angewandte Methode zur Untersuchung struktureller und funktioneller Veränderungen der Zelloberfläche ist die Wechselwirkung von Lektinen mit Rezeptoren der Zelloberflächenmembran.

Durch die Anwendung verschiedener Methoden ist es bereits vielen Autoren gelungen, die Anzahl von Bindungsstellen und ihre Verteilung und Anordnung an der Zelloberfläche transformierter und nicht transformierter Zellen zu bestimmen. Neben Immunofluoreszenz-Tests mit Anti-Con A - Seren und Fluorescein-gekoppelten Globulin (MALLUCCI, 1971) wurden von NICOLSON (1971) auch Versuche mit Ferritin-gekoppelten Con A durchgeführt. Eine genaue Lokalisation dieser Rezeptoren erlaubt die ultrastrukturelle Auswertung zytochemischer Analysen (MARTINEZ - PALOMO et al. 1972; TORPIER und MONTAGNER, 1973; ROTH, 1975; ROTH und BINDER, 1976).

Sowohl normale wie neoplastische Zellen sind in der Lage, Con A zu binden. Für das unterschiedliche Agglutinationsvermögen gilt die Ansicht, daß Tumorzellen eine größere Zahl von Rezeptoren für Con A besitzen und demzufolge mehr Con A - Moleküle anlagern können als normale nicht transformierte Zellen. Die Bindungsstellen scheinen auf der Zelloberfläche von transformierten Zellen in Büscheln angeordnet zu sein. Die Rezeptoren normaler Zellen sind gleichmäßiger verteilt und können in einer "maskierten" bzw. kryptischen Form vorliegen (WALBORG et al. 1975).

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß nach einer kurzen und milden Behandlung mit proteolytischen Enzymen, auch nicht transformierte Zellen agglutinieren (PETRIS und RAFF, 1973; BURGER, 1973). Die proteolytische Wirkung des Trypsins bewirkt eine enzymatische Freilegung der kohlenhydrathaltigen Bindungsstellen und somit eine "De-maskierung" Con A bindender Rezeptoren (BURGER, 1973; PETRIS und RAFF, 1973; WALBORG et al. 1975).

Untersuchungen in jüngster Zeit haben gezeigt, daß neoplastische Zellen eine Oberflächenstrukturierung besitzen, die bei normalen Zellen nur während der Mitose zu beobachten ist (BURGER, 1973; HALLE, 1976). Außerdem soll die Con A - Agglutinierbarkeit auch von der intrazellulären Konzentration zyklischen AMP abhängig sein (BURGER, 1973; VLODAVSKY et al. 1973).

C. PROBLEMATIK

Die bislang vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß es sich bei den durch chemische Karzinogene induzierten neurogenen Tumoren meist um primär heteromorphe Formen handelt. Diese Befunde werden durch die in vitro-Beobachtungen bestätigt, wobei die aus den Explantaten auswandernden Zellen das Bild der Primärkultur prägen. Neben tumortypischen Zellformen wird stets auch das Auswachsen nicht neoplastischer Zellen des Geschwulststromas beobachtet. Während in Primärkulturen Emigrationsprozesse überwiegen, wird das Verhalten von Langzeitkulturen durch Proliferationen bestimmt. Dies kann mit zunehmender Kultivationsdauer zu einer Selektion der ursprünglich vorhandenen Zelltypen führen, wobei die Zellart mit der größten Proliferationsgeschwindigkeit andere Arten überwuchert (THUST, 1976).

Im Gegensatz zu mesenchymalen Zellen des Menschen lassen sich normale Zellen der Ratte unbegrenzt züchten (HAY, 1970). Eine beachtliche Proliferation von Fibroblasten wurde von THUST und WARZOK (1974) in einigen Astrozytom-Kulturen beobachtet.

Neben diesen Ausleseprozessen kommt es im Laufe der Kultivationsdauer oft zu anaplastischen Veränderungen. Diese äußern sich in einer zunehmenden Polymorphie oder, wie BENDA et al. (1971) beschreiben, in einer "Entdifferenzierung in eine einfachere Form". Zellen, die ursprünglich lange Fortsätze ausbilden, nehmen - infolge einer gewissen Adaption an die Bedingungen in vitro - einen epithelialen Habitus an (MANUELIDIS, 1969).

Auf Grund der in vitro zu beobachtenden Selektionsprozesse und morphologischen Veränderungen ist für die

Entwicklung eines Testsystems notwendig, nicht nur permanente Zellkulturen zu etablieren, sondern durch geeignete Techniken Zelllinien mit definierten Eigenschaften zu isolieren, die für viele neurophysiologische, immunologische und biochemische Untersuchungen wünschenswert sind.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es:

- a) Experimentell induzierte neurogene Tumoren in vitro zu züchten.
- b) Die gewonnenen Kulturen durch in vitro/in vivo Wechselfassagen zu stabilisieren.
- c) Aus den etablierten Zellkulturen Zelllinien zu isolieren und zu charakterisieren.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Tierversuche

Als Versuchstiere verwendeten wir 60 drei Monate alte Sprague-Dawley Ratten männlichen Geschlechts. Die Tiere wurden unter gleichen Bedingungen einzeln in Macrolon^R-Käfigen gehalten. Sie erhielten als Standarddiät Altromin^R und Wasser ad libitum.

Die Tumorinduktion wurde nach Angaben von DRUCKREY et al. (1965) durchgeführt. Die Versuchstiere bekamen wöchentlich - nach einer Durstperiode von 24 Stunden - 6 mg/kg N-Methyl-N-nitrosoharnstoff (MNH) gelöst in 10 ml Leitungswasser. Die MNH-Lösung wurde mit 1%igem primären Natriumphosphat gepuffert und auf pH 6,2 eingestellt (THOMAS et al. 1967). Die Verabreichung erfolgte solange, bis einzelne Tiere starben oder im moribunden Zustand mit Äther narkotisiert und durch Herzpunktion entblutet wurden.

Das für die Serumherstellung gewonnene Blut wurde vorsichtig in spitzzulaufende Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur vollständigen Gerinnung bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dem Gerinnen des Blutes wurden die Röhrchen für eine Stunde bei 37°C in den Brutschrank und anschließend für eine weitere Stunde bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Der Blutkuchen wurde sodann 20 min bei 3000 U/min abzentrifugiert und das überstehende Serum vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

1.2. Histologische Untersuchung

Nach der Sektion wurde ein Teil des Tumors für die lichtmikroskopische Untersuchung in 6%igem neutralem Formol, das 0,9% NaCl enthielt, fixiert und in Paraplast^R eingebettet. Die Schnitte wurden nach den üblichen Verfahren behandelt und mit Hämatoxilin-Eosin oder nach NISSL gefärbt.

Für zellmorphologische Untersuchungen wurden dicht bewachsene Kulturfläschchen (Wuchsfläche 25 cm^2) in situ oder Deckgläschenkulturen, die in Leighton-tubes angelegt wurden, gefärbt.

Die zu färbenden Lamellen wurden dreimal in PBS-A (Ca^{++} - und Mg^{++} -freie Phosphate-Buffered-Saline, pH 7,2) gewaschen und in einer frisch angesetzten Bouin-Lösung (15 ml einer gesättigten, wässrigen Pikrinsäurelösung, 5 ml einer 40%igen Formaldehydlösung, 1 ml Eisessig) 30 min fixiert. Dann wurden die Lamellen zweimal in 95%igem Alkohol und anschließend in 75%igem Alkohol bis zum Verschwinden der gelben Farbe gewaschen. Nach zweimaligem Spülen in Aqua dest. wurden die Präparate 10 min mit Hämatoxilin gefärbt, in lauwarmem Wasser gewässert, bis keine blauen Schlieren mehr auftraten, und 12 - 15 min mit Eosin gefärbt. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurden die Lamellen in aufsteigender Alkoholreihe sowie Xylol dehydriert und in Kanadabalsam eingebettet.

Einige Zellkulturen wurden in situ in den Plastikflaschen gefärbt. Der Färbevorgang erfolgte hier wie bei den Lamellen, nur die letzte Dehydrierung in Xylol entfällt. Vor der Einbettung in Glycerin-Gelatine wurde der Boden der Fläschchen mit einem glühend gemachten Skalpell herausgeschnitten.

1.3. Elektronenmikroskopische Untersuchung^{*6}

Für die ultrastrukturelle Untersuchung wurden unmittelbar nach der Tötung der Tiere Tumorproben entnommen und in Blöckchen von 1 mm³ Kantenlänge zerkleinert, die zuerst 2 Stunden lang in gepuffertem, 6,25%igem Glutaraldehyd fixiert, danach in Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,4) gewaschen und 2 Stunden in 1%igem Osmiumtetroxid nachfixiert. Hierauf wurden die Blöckchen in Aceton dehydriert und Epon eingebettet. Semidünn- bzw. Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

Die Zellkulturen wurden in den Gewebekulturflaschen belassen und in situ dreimal mit PBS-A gewaschen, 15 min in 2,5%igem Glutaraldehyd (gelöst in PBS-A) fixiert, fünfmal mit PBS-A gewaschen und anschließend 1 Stunde in 1%igem Osmiumtetroxid fixiert. Nach der Dehydrierung mit Alkohol wurden die Flaschen in Epon eingebettet und bei 37°C gehärtet. Der obere Teil der Flasche wurde zuvor mit einem erhitzten Messer abgeschnitten. Zur Untersuchung gelangten Semidünn- und Ultradünnschnitte.

^{*6} Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Frau Dr. Brigitte Schröder (Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie des Fachbereichs für Tiermedizin, München) und Herrn Dr. Anzil (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) durchgeführt.

1.4. Gewebekultur

a) Tumorzellkulturen

Bei den getöteten Tieren wurde unter sterilen Bedingungen das Gehirn und das Rückenmark, einschließlich der entstandenen Tumoren, entnommen. Das für die Gewebezüchtung ausgewählte Tumorstück wurde sofort mehrmals in einer lauwarmen, sterilen PBS-A Lösung gewaschen, mit einer Schere in 1 mm^3 große Stückchen zerkleinert und mit einer gebogenen Pinzette in eine Falcon-Plastik-Flasche (Seromed-München) explantiert. Nach dem Antrocknen wurden die Gewebestückchen mit Medium (M 199, Seromed-München), welches 15-20% fetales Kälberserum (FKS, Seromed-München), 8,8% NaHCO_3 und Antibiotika (100 I.E. Penicillin/ml, $100\text{ }\mu\text{g}$ Dihydrostreptomycin/ml) enthielt, vorsichtig überschichtet. Die Kulturen wurden im geschlossenen System gehalten und bei 37°C bebrütet.

b) Gliazellkulturen

Das Gehirn von neugeborenen Ratten wurde unter sterilen Bedingungen entnommen, mit PBS-A gewaschen und mit der Schere in Fragmente von 1 mm^3 Kantenlänge zerkleinert. Die Gewebestückchen der Großhirnhemisphären und des Kleinhirns wurden getrennt in Falcon-Plastikflaschen explantiert, mit M 199/10% FKS überschichtet und im geschlossenen System bei 37°C bebrütet. Die 5., 7. und 9. Passage jeder Zelllinie wurde für den Con A-Agglutinationstest und zu Kontrolluntersuchungen bei der zytochemischen Darstellung von Con A-Rezeptoren verwendet.

1.4.1. Subkulturen

Die Primärkulturen wurden im Verhältnis 1:2 subkultiviert. Die Subkulturen wurden mit der Trypsinierungsmethode hergestellt. Der Zellrasen wurde mit einer erwärmten STV-Lösung (Saline-Trypsin-Versen, MARCUS et al. 1956) überschichtet und unter Wiegen vorsichtig gewaschen. Nach dieser Vortrypsinierung wurde die Waschlösung abgegossen und der Zellrasen mit 1-2 ml STV, je nach Größe der Plastikflaschen, erneut überschichtet. Die Kulturen wurden 3-5 min, je nach Zellart, bei 37°C im Brutschrank belassen, bis sich alle Zellen von der Unterlage gelöst hatten oder durch vorsichtiges Schütteln der Kulturgefäße der gleiche Effekt erzielt wurde. Die abgelösten Zellen wurden mit etwas Medium/10% FKS resuspendiert. Auftretende Zellaggregate wurden durch kräftiges Aufziehen und Ausblasen mit einer Pipette gelöst. Die Zellsuspension wurde mit Nährmedium auf die entsprechende ml-Menge verdünnt und 1:2 geteilt. Gut wachsende Kulturen höherer Passageraten konnten je nach Zellart auch im Verhältnis 1:3 bzw. 1:4 geteilt werden.

1.4.2. Konservierung und Lagerung der Zellen

Alle vier bis acht Wochen wurden Zellen unter Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) durch Tiefgefrieren konserviert. Der Zellrasen wurde abtrypsiniert und die Suspension 5 min bei 800 U/min abzentrifugiert. Das Sediment wurde im Medium mit 15-20% FKS suspendiert und mit 9-10% DMSO (je nach Verträglichkeit der Zellart) versetzt. Die Zellzahl wurde vorher auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in dafür vorgesehene Glas- oder Plastikgefäße abgefüllt, die Fläschchen verschlossen und 4 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert. In dieser Zeit kann das DMSO in die Zellen eindringen und das in der Zelle vorhandene Wasser binden. Anschließend wurden die Zellen bei -70°C eingefroren. Das Auftauen der tiefgefrorenen Zellen erfolgte innerhalb 1 min im Wasserbad bei 37°C . Die Zellen wurden suspendiert, mit 4 ml Medium/20% FKS verdünnt und in Plastik-Flaschen mit einer Wuchsfläche von 25 cm^2 ausgesät und bei 37°C bebrütet. Nach etwa 4-6 Stunden wurden die Flaschen lichtmikroskopisch geprüft. Wenn sich genügend Zellen abgesetzt hatten, wurde das Nährmedium sofort oder auch am nachfolgenden Tag gewechselt.

Für eine kurzdauernde Lagerung der Zellen bei Zimmertemperatur wurden gut wachsende Kulturen aus dem Brutschrank genommen und zugedeckt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Grundsätzlich braucht während dieser Zeit kein Mediumwechsel zu erfolgen. Vor ihrer Weiterverwendung müssen die Zellkulturen 12-24 Stunden bei 37°C bebrütet werden, erst dann können die Zellen subkultiviert werden. Die Dauer der Lagerung richtet sich nach der Haltbarkeit der Zellen.

1.4.3. Klonierung

Zur Klonierung wurde die Zellkultur herangezogen, die eine hohe Passagerate aufwies und die sich in ihren Wachstumseigenschaften konstant verhielt. Die Lebensfähigkeit der Einzelzellen konnte erst durch eine in vitro-in vivo-Passage verbessert werden. Die Zellen

der zu klonierenden Kultur wurden auf Balb c/nu nu Mäuse und Sprague-Dawley Ratten transplantiert. Zur Erzeugung von Transplantationstumoren wurden den Mäusen 1×10^6 Zellen und den Ratten 5×10^5 Zellen, welche in PBS-A bzw. in Medium (M 199) suspendiert waren, im Inguinalbereich s.c. inokuliert. 2-3 Wochen nach der Transplantation waren die Tumoren ca. erbsengroß. Die Tiere wurden mit Äther getötet, die Geschwulst unter sterilen Kautelen exstirpiert und eine Explantatkultur, wie unter 1.2. beschrieben, angelegt. Die 2. oder 3. Passage der Transplantatkulturen konnten zu den Klonierungsversuchen verwendet werden.

Die zu klonierenden Zellen wurden abtrysiniert und 5 min bei 800 U/min abzentrifugiert. Das Sediment wurde in etwas Medium suspendiert, die Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt und die Zellzahl auf 60-100 Zellen pro ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde mit 4-5 ml Medium/15% FKS verdünnt und in eine kleine Gewebekulturflasche pipettiert. Bei Farbumschlag des Mediums in einen alkalischen pH-Bereich wurde dem Nährmedium conditioniertes Medium (CM) im Verhältnis 1:2 zugesetzt.

Die Herstellung des CM erfolgte in Anlehnung an die Angaben von CHEN et al. (1975). Dazu wurde das Medium einen Tag alter Subkulturen der ursprünglichen Zellkulturen verwendet. Die Nährlösung wurde abgegossen, bei 1500 U/min abzentrifugiert und dreimal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut. Vorhandene proliferationsfähige Zellen werden durch diese Präparation zerstört und eine Verunreinigung der zu klonierenden Zellen vermieden.

Nach ca. 10-15 Tagen konnte das Auswachsen sichtbarer Zellkolonien beobachtet werden. Die einzelnen Klone wurden mittels Trypsinierung isoliert. Hierzu wurden 5 mm hohe Metallzylinder mit einer gebogenen Pinzette vorsichtig auf die vorher gekennzeichneten Kolonien aufgesetzt. In die Zylinder wurde ein Tropfen STV-Lösung eingefüllt. Nach einer Einwirkungszeit von ca. 5 min wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette aufgezogen und in neue Kulturgefäße mit 5 ml Nährlösung gebracht. Die Subklonierung wurde 3-5 mal durchgeführt, erst dann wurden die Subklone als Kultur weitergezüchtet.

Die Prüfung des Klonierungsvermögens erfolgte nach jeder 5. Passage.

1.4.4. Chromosomendarstellung *

Für eine erfolgreiche Chromosomenanalyse ist grundsätzlich eine möglichst große Zahl von Zellen in Mitose erforderlich. Kulturen mit einem nicht zu dicht gewachsenen Zellrasen weisen jedoch in der Regel genügend Zellen auf, die sich in Teilung befinden.

* Die zytogenetische Auswertung der Chromosomenpräparation wurde von Herrn Dr. Zankl (Institut für Human-genetik der Med. Fakultät der Universität des Saarlandes, Prof. Zank) durchgeführt.

Zu unseren Untersuchungen wurden die Zellen subkultiviert, ausgesät und 16-20 Stunden nach der Aussaat unter dem Umkehrmikroskop auf Zelldichte und Teilungsaktivität kontrolliert. Wenn 20-30 Mitosen pro Gesichtsfeld gezählt werden konnten, wurde der Test durchgeführt. Im Nativpräparat sind Zellen, die sich in Teilung befinden, rund, leuchtend und granuliert.

Zuerst wurde eine 0,01 mg%ige Colcemid-(Ciba) Gebrauchslösung hergestellt (1 Ampulle Colcemid - 1ml/1mg - werden mit 99 ml physiologischer NaCl-Lösung verdünnt) und 0,5 ml/ml Medium auf die Kulturen gegeben. Nach einer Einwirkungszeit von 3-4 Stunden bei 37°C wurde das Medium abgegossen, 5 min bei 800 U/min abzentrifugiert und die Kulturen mit erwärmter PBS-A Lösung zweimal gewaschen. Der Zellrasen wurde mit 2 ml STV-Lösung abtrypsiniert und zusammen mit der Waschlösung (PBS-A) 5 min bei 750 U/min abzentrifugiert. Das Zellsediment der ersten und der zweiten Zentrifugation wurde vereinigt, mit 5 ml einer hypotonen Lösung (1 Teil Hank's Solution und 3 Teile Aqua bidest.) vermischt und 18 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (7 min bei 800 U/min) wurde das Zellsediment zunächst tropfenweise in frisch angesetztem, eisgekühltem Fixativ (Eisessig/Methanol 1:3) resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Vorgang Resuspendieren im Fixativgemisch und Zentrifugation (7 min bei 800 U/min) wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Wechsel wurde der Rückstand mit etwas Fixierflüssigkeit so verdünnt, daß eine milchigtrübe Suspension entstand. Von der Zellsuspension wurden 5 Tropfen auf einen Objektträger aufgetropft, die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und die Präparate luftgetrocknet. Die Objektträger wurden vor der Verwendung in einem Äther-Alkohol-Gemisch (1:1) entfettet und in eisgekühltem Aqua bidest.

aufbewahrt. Die ungefärbten Probepräparate wurden unter dem Mikroskop kontrolliert.

Wenn die Chromosomen nicht genügend ausgebreitet sind, müssen größere Tropfen der Zellsuspension auf die Objektträger aufgetragen werden und die Präparate auf einer 60°C warmen Platte getrocknet werden.

Die Färbung geschieht nach der sog. GTL-Technik (Giemsa-Banden mit Trypsin-Leishmann) modifiziert nach SPERLING und WIESNER (1972) und WALTHER et al. (1974). Die Färbelösung wird hergestellt aus:

1. Einem Teil Leishmann Eosin-Methylenblau-Lösung (jeweils frisch ansetzen).
2. Drei Teilen Sörensen-Puffer im Mischungsverhältnis von 49,8 Teilen einer 0,06 mol $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Lösung und von 50,2 Teilen einer 0,06 mol KH_2PO_4 Lösung (pH=6,9). (Die einzelnen Lösungen können Monate lang im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt werden).
3. Trypsinlösung 0,25%, Endkonzentration 1:600 (jeweils frisch angesetzt).

Herstellung der Leishmann-Lösung: 120 mg Trockensubstanz in 100 ml Methanol bei 60°C im Wasserbad 30 min auflösen.

Nach 10 min kontrolliert man die angefärbten Präparate unter dem Mikroskop, um ein Überfärben zu vermeiden. Ein optimaler Kontrast zwischen den Banden und den Interbanden läßt sich schon nach 10 min, spätestens nach 12 min feststellen.

Es können auch Korrekturen an einem ersten Färbeergebnis vorgenommen werden: Bei Unterfärbung ist durch eventuelles Nachfärben (2-5 min) noch eine Steigerung der Differenzierung zu erreichen, überfärbte Präparate können durch Behandlung mit 75%igem Alkohol entfärbt werden.

1.5. Immunologische Untersuchungen

1.5.1. Immunofluoreszenz

a) Zytologischer Nachweis des S-100 Proteins

Zum immunohistochemischen Nachweis des gliaspezifischen S-100 Proteins wurde die indirekte Immunofluoreszenz-Technik (Sandwich-Technik, COONS et al. 1957) angewendet.

Für den Test wurden nicht zu dicht bewachsene Deckgläschenkulturen verwendet. Die Lamellen wurden mit einer gebogenen Pinzette aus den Leighton-tubes entnommen, dreimal 5 min in PBS-A gewaschen, 30 sec in kaltem Azeton ($+4^{\circ}\text{C}$) fixiert und 5 min bei Zimmertemperatur getrocknet. Auf die fixierten Lamellen wurde Anti-S-100 Serum (1:2 - 1:32) getropft und mit einem gebogenen Glasstab vorsichtig verteilt. Die Lamellen wurden 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert, dreimal 5 min in PBS-A gewaschen, getrocknet und mit FITC-gekoppeltem Anti-Kaninchen-Globulin (1:32) vom Schaf (Flow Laboratories, Scotland) abermals 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überschuß entfernt, die Lamellen dreimal in PBS-A gewaschen und mit gepuffertem Glycerol eingedeckelt.

Als Kontrolle dienten Lamellen, die mit absorbiertem Anti-S-100 bzw. ohne Anti-S-100 Serum mit normalem Kaninchenserum inkubiert wurden.

Für den Test stand ein nach der Methode von MOORE (1965) isoliertes S-100-Antigen zur Verfügung. Genaue Angaben über die Isolierung des S-100 Proteins sowie über die Gewinnung des Anti-S-100 Serums finden sich bei HAGLID und STAVROU (1973).

b) Nachweis humoraler Antikörper im autologen System

Zum Nachweis von humoralen Antikörpern im Serum tumortragender Ratten wurde die o.b. Immunofluoreszenz-Technik benutzt. Für den Test wurden fixierte und unfixierte Lamellen, die Fixierung mit Azeton entfiel, verwendet. Auf die getrockneten und gewaschenen Lamellen wurden 50 bis 100 μ l des zu testenden Antiserums (1:2 - 1:8) aufgetropft und die Lamellen 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS-A (dreimal 5 min) wurden die Lamellen mit verdünntem (1:2 - 1:32) Konjugat (Kaninchen-Anti-Ratten-Globulin, gekoppelt an Fluoresceinisothiocyanat) 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Überschusses und erneutem Waschen in PBS-A wurden die Lamellen mit gepuffertem Glycerol eingedeckelt.

1.5.2. Mikrozytotoxizitäts-Test

Der in vitro Nachweis humoraler zytotoxischer Antikörper im autologen System erfolgte durch den Mikrozytotoxizitäts-Test (AMOS, 1969; KLEIN et al. 1974). Der komplementabhängige Test wurde für den C₆-Astrozytomklon adaptiert (ELLING, 1977) und für den beschriebenen Versuch übernommen.

Für den Test wurden Terasaki-Platten (Falcon Nr. 3034, Seromed-München) mit 60 Löchern verwendet. Die Zellen wurden mechanisch abgelöst, gezählt und auf 500 000 Zellen/ml eingestellt. Mit einer Hamiltonspritze (100 μ l) mit Dispensiervorrichtung wurden die Zellen in die Löcher geknipst. So wurden pro Loch 2 μ l der Zellsuspension verteilt. Das entspricht einer Zellzahl

von ca. 1000 Zellen. Danach wurden 2 μ l des Antiserums zugegeben, die Platten verschlossen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde auf jedes Loch mit einer Pasteurpipette 1 Tropfen Medium aufgetragen (1 Tropfen = 25 μ l) und nach 10 min das Medium dekantiert. Hierauf wurden pro Loch 2 μ l Komplement hinzugegeben. Als Komplementquelle dienten Kaninchenserum, da sich Meerschweinchenserum als zu schwach erwiesen. Die Platten wurden verschlossen und 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Schluß wurden die Platten 5 min in den Kühlschrank gestellt und danach auf jedes Loch 1 Tropfen Formalin als Fixativ aufgetragen (6% mit 0,9% NaCl). Die Platten wurden mit einem Objektträger abgedeckt und sofort im umgekehrten Phasenkontrastmikroskop ausgewertet und das Verhältnis lebende Zellen:tote Zellen berechnet.

Bei jedem Test wurden eine positive und zwei negative Kontrollen durchgeführt. Die positive Kontrolle erfolgte mit Kaninchen-Anti-Ratten-Serum (KARS), dessen Herstellung in der Dissertation von ELLING (1977) beschrieben wird. Das heterologe Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

Bei der positiven Kontrolle sollen alle Zellen lysiert sein. In den negativen Kontrollen werden die Zellen einmal nur mit Medium und einmal mit Medium und Komplement inkubiert. Der Prozentsatz der toten Zellen soll in beiden negativen Kontrollen 10% nicht überschreiten.

Die zytotoxischen Eigenschaften der Seren gliom- und schwannomtragender Tiere wurden durch Absorption der Seren an die entsprechenden in vitro kultivierten Tumorzellen und normale Gliazellen überprüft.

Für die Auswertung des Testes ist folgendes zu beachten: Tote Zellen erscheinen dunkler, der Zellkern ist deutlich sichtbar, lebende Zellen besitzen einen hellen Rand und wirken dreidimensional. Zellen, die in ihrem Erscheinungsbild zwischen den beiden Kriterien liegen, sind zu den lebenden zu zählen.

1.6. Nachweis von Concanavalin-A-Rezeptoren an der Zellmembran von Glia- und Gliomzellen

1.6.1. Agglutinationstest

Für den Versuch wurden normale Gliazellen und Tumorzellen verwendet. Das Medium wurde abgegossen und die Zellen mit PBS-A gewaschen. Mit einer Pipette wurden die Zellen mechanisch von der Unterlage abgespritzt und 5 min bei 800 U/min zentrifugiert. Das Sediment wurde in PBS-A resuspendiert und die Zellzahl auf 10^6 Zellen pro ml eingestellt. Die Bestimmung der Vitalität der Zellen erfolgte durch Färbung mit Trypan-Blau; sie betrug ca. 90%. Vor dem Test wurde von einer 0,1%igen Con A-Lösung (gelöst in PBS-A) eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:2048 hergestellt. Gleiche Volumina der Zellsuspension wurden mit gleichen Volumina der Con A-Lösung vermischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Auswertung der Agglutinationsintensität erfolgte mit Hilfe einer semiquantitativen Skala, die von + bis ++++ reichte. Das Symbol ++++ bedeutet, daß nahezu alle Zellen in der betreffenden Verdünnung zu Klumpen agglutiniert waren.

Für die Auswertung wurden mit einer Pasteurpipette von den inkubierten Suspensionen Proben entnommen, auf einen entfetteten Objektträger getropft und im Lichtmikroskop ausgewertet.

Proteolytische Enzyme können die Struktur der Zellmembran verändern, deshalb wurden für den Test auch Zellen verwendet, die mittels Trypsinierung (0,25%iges Trypsin gelöst in PBS-A) geerntet wurden.

1.6.2. Zytochemische Darstellung

Tumorzellen und normale Gliazellen wurden in Falcon-Plastik-Flaschen mit einer Wuchsfläche von 25 cm^2 angelegt. Sobald der Zellrasen gleichmäßig dicht gewachsen war, wurde der Test in modifizierter Art nach Angaben von BERNHARD und AVRAMEAS (1971) durchgeführt. Der Nachweis Concanavalin-A-bindender Komponenten wurde in situ an den Zellen durchgeführt.

Die Zellkulturen wurden nach dem Abgießen des Nährmediums mit PBS-A (dreimal 5 min) gewaschen, 15 min bei Zimmertemperatur mit Con A (Con A: $50 \mu\text{g/ml}$ gelöst in PBS-A) inkubiert, abermals mit PBS-A gewaschen (dreimal 5 min) und 15 min mit Peroxydase (Peroxydase: $50 \mu\text{g/ml}$ gelöst in PBS-A) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS-A (dreimal 5 min) gewaschen, 15 min in einer 2,5%igen Glutaraldehyd-Lösung (gelöst in PBS-A) fixiert und mit PBS-A (fünfmal 5 min) gewaschen. Die Peroxydase-Aktivität wurde mit der Diaminobenzidin-Reaktion (GRAHAM und KARNOWSKY, 1966) nachgewiesen. Das 3'3-Diaminobenzidin-tetrachlorid wurde in einer Konzentration von $0,5 \text{ mg/ml}$ in PBS-A gelöst, mit zwei Tropfen H_2O_2 versetzt und filtriert. Die Zellen wurden viermal mit PBS-A gewaschen und eine Stunde lang in 1%igem OsO_4 (gelöst in PBS-A) nachfixiert. Die Dehydrierung der Zellen erfolgte mit Äthanol steigender Konzentrationen (70%, 95% und 100%), die Einbettung in Epon.

Die Spezifität der Reaktion wurde durch Zusatz von 0,2 M Methyl- α -D-mannopyranosid zu der Con A und Peroxydase-Lösung überprüft. Zusätzlich wurde der Effekt der Präfixation von Con A-bindenden Rezeptoren geprüft, indem einige Kulturen vor der Inkubation mit Con A 15 min bei Zimmertemperatur mit 2,5%igem Glutaraldehyd fixiert wurden.

Nach der Polymerisation des Epons wurden die in situ eingebetteten Zellen durch Abbrechen des Plastikmaterials aus den Flaschen herausgelöst. Zur Untersuchung gelangten Semi- und Ultradünnschnitte, die mit einem LKB-Mikrotom hergestellt und mit Azur II bzw. Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert wurden.

2. Ergebnisse

2.1. Tumorinduktion

Durch die wöchentliche perorale Verabreichung von 6 mg/kg N-Methyl-N-nitrosoharnstoff mit dem Trinkwasser (pH 6,1 - 6,2) an drei Monate alte Sprague-Dawley-Ratten konnten 34 Tumoren induziert werden. Die mittlere Induktionszeit betrug ca. 369 (350 - 559) Tage bei einer durchschnittlichen Gesamtdosis von 290 (270-400) mg/Tier. Aus dieser Tumorserie wurden 22 chemisch induzierte, neurogene Neoplasien in der Gewebekultur gezüchtet. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems handelt es sich um weitgehend anaplastische Geschwülste, die in der Tabelle 1 zusammengefaßt sind.

Tabelle 1: Übersichtliche Darstellung der in Kultur
genommenen Tumoren und die Anzahl der bis
heute überlebenden Kulturen

Tumortyp	Anzahl	heute noch in Kultur
<u>I. ZNS-Tumoren</u>		
1. Oligodendrogliome	3	-
2. Astrozytome	2	-
3. Mischgliome	4	-
4. Pleomorphe Gliome	6	2
<u>II. PNS-Tumoren</u>		
Neurinome	7	2

Von den 22 in Kultur genommenen Tumoren konnten drei Primärkulturen nicht subkultiviert werden, weitere acht Kulturen überlebten nur bis zur 4. bis 7. Passage, sieben Zellkulturen gingen entweder durch Infektionen oder technische Fehler zu Grunde. Die vier noch existierenden Kulturen befinden sich in der 130. bis 140. Passage.

Diese vier Tumoren und die Langzeitkulturen dieser Neoplasien wurden eingehend untersucht.

2.2. Lichtmikroskopische Befunde

2.2.1. Primärtumoren

a) Pleomorphe Gliome

Diese Tumorart entwickelt sich entweder durch fortschreitende Entdifferenzierung aus primär isomorphen oder heteromorphen Gliomen oder ist bereits als primär pleomorphes Gliom angelegt (STAVROU, 1971). Primär heteromorphe Gliome, die durch gleichzeitige Anaplasie mehrerer Gliotypen eines Hirnareals gekennzeichnet sind, treten bei induzierten Gliomen weitaus häufiger auf, als primär isomorphe Gliome (STAVROU, 1969; THUST und WARZOK, 1974).

Die untersuchten pleomorphen Gliome zeigen eine ausgeprägte Zell- und Kernpolymorphie sowie ein infiltrativ destruierendes Wachstum. Die peripheren Areale sind äußerst zellreich. Neben zahlreichen Mitosen, Monster- und Riesenzellen sind auch pathologische Mitosen reichlich vorhanden. Die Vaskularisation der Tumoren besorgen sowohl kapillare als auch größere Gefäße, wobei die großlumigen Gefäße mehr an der Peripherie liegen. Neben mehr oder weniger ausgedehnten Hämorrhagien und teilweise kavernös erweiterten Gefäßen wird das Tumorparenchym von Nekrosen unterschiedlicher Ausdehnung durchzogen. An ihren Rändern liegen die Tumorzellen häufig wie zu Pseudopalisaden formiert (Abb. 1a).

b) Pleomorphe Neurinome

Die morphologischen Charakteristika chemisch induzierter PNS-Tumoren der Ratte sind wiederholt beschrieben worden (STAVROU, 1969; 1970; JÄNISCH und SCHREIBER, 1969), wobei zu bemerken ist, daß verschiedene Stufen

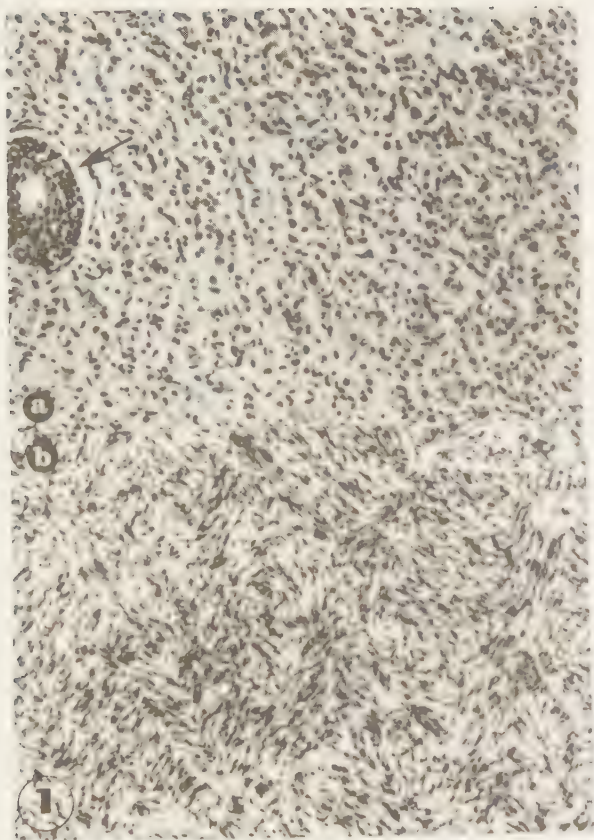


Abb. 1 Experimentell induziertes pleomorphes Gliom mit perivaskulärer lymphoplasmozytärer Infiltration (→) (a); experimentelles Neurinom mit fischzugartigen Zellformationen (b). (NISSL-Fbg. a, b: 120x)

der Reife fast regelmäßig im gleichen Tumor vorkommen (STAVROU, 1971; MENNEL und ZÜLCH, 1971; SWENBERG et al. 1972 und DENLINGER et al. 1973).

Bei den hier untersuchten Tumoren handelt es sich um Nervenwurzelgeschwülste. Die langgestreckten Zellen erscheinen mehr oder weniger ausgeprägt, in Zügen oder Wirbeln angeordnet. Mitosen sind vor allem in den polymorphen, zellreichen Tumorarealen zu sehen. Auf Grund der Kernpleomorphie, des Zellreichtums und des Vorkommens riesenzellähnlicher Bildungen im Tumorparenchym sowie des infiltrativen Wachstums können diese Tumoren als maligne Geschwülste aufgefaßt werden. Im Tumorparenchym finden sich auch zahlreiche Mastzellen (Abb. 1b).

2.2.2. Langzeitkulturen

a) Pleomorphe Gliome

Die morphologischen Variationen kultivierter Zellen hängen von vielen Faktoren wie Alter der Kultur, Zelldichte, Zeitpunkt der letzten Subkultivation etc. ab. Die von uns kultivierten Gliome zeigen in vitro ein außerordentlich schnelles Wachstum. Bereits 24 Stunden nach dem Anlegen der Primärkulturen konnten aus den Explantaten auswandernde Zellen beobachtet werden. Die hohe Proliferationsgeschwindigkeit in vitro ist bis zum heutigen Zeitpunkt erhalten geblieben. Das Nährmedium muß meist nach 24 Stunden, spätestens 26 Stunden erneuert werden, auch wenn die Subkultivierungsrate 1:4 beträgt und die Zellen erst zu 60% konfluent sind. Diese Tumorzellen lösen sich unter Einwirkung der STV-Lösung (Saline-Trypsin-Versene) innerhalb von 2 min vom Flaschenboden, neigen jedoch bei zu geringem

Suspendieren der Zellösung zur Aggregatbildung. Die Lagerung der Kulturen bei Zimmertemperatur ist nahezu unmöglich, da sich die Zellen schon nach 24-48 Stunden, wie unter stark saurem Milieu, zusammenziehen und von der Unterlage ablösen. Ein Wiederanzüchten bei 37°C ist nach zu langer Aufbewahrung (8-10 Tage) nicht mehr möglich.

Die im Schnittpräparat erkennbaren Zellformen sind meist auch in der in vitro-Kultur vorhanden. In den ersten 7 Passagen überwiegen polygonale protoplasma-reiche Zellen. Nach längerer Kultivationsdauer dominieren schlanke, bipolare Zellen. Riesenzellen sind vermehrt zu beobachten, neben mehr rundlich geformten, unipolaren Zellen sind Zellen mit stummelartigen Fortsätzen zu finden. Die vielkernigen Riesenzellen haben ein oft schleierartig ausgebreitetes Zytoplasma. Auf den ersten Blick wirken diese Zellen wie unbewachsene Stellen der Kulturflasche. Langzeitkulturen weisen kurz nach der Subkultivierung, bei nicht zu großer Zelldichte, hauptsächlich bipolare Spindelzellen auf, stellenweise sind astrozyten- oder oligodendrozytenähnliche Zellen mit zahlreichen Fortsätzen zu sehen. Bei 100 %iger Konfluation des Zellrasens zeigt eine der beiden Kulturen einen mehr epithelialen Habitus, bei der zweiten Kultur bleibt mehr die polygonale Form der Zellen erhalten und Zellfortsätze sind häufiger zu sehen (Abb. 2a und 3a).

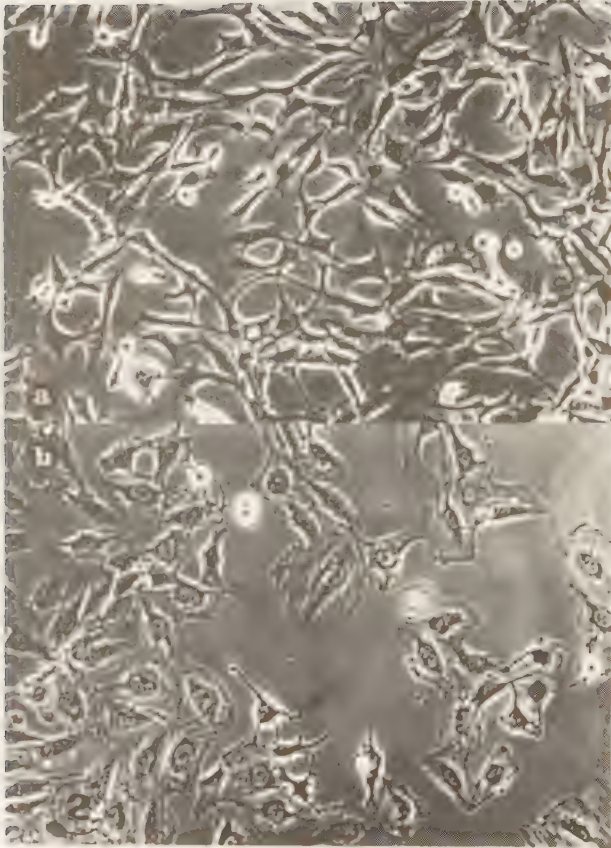


Abb. 1 In vitro Wachstum eines pleomorphen Glioms (102. Passage) mit vorwiegend bipolaren und einzelnen multipolaren Zellformen (a) und eines pleomorphen Neurinoms (132. Passage), welches hauptsächlich aus polygonalen und einzelnen fortsatzbildenden Zellen besteht (→) (b). (Phasenkontrast, Prim.Vergr.: 10x)

b) Pleomorphe Neurinome

Alle explantierten PNS-Tumoren konnten unter den in vitro-Bedingungen zum Wachstum gebracht werden. Bei den Tumoren konnte bereits zwei Tage nach Kultivationsbeginn eine breite Zone aus den Explantaten auswandern-der Zellen beobachtet werden. Der dominierende Zelltyp ist eine längliche Zelle mit schlankem Zellkern, schmal-lem Zytoplasmasaum und ausgestreckten Fortsätzen. Im Verlauf langzeitiger Kultivation treten anaplastische Veränderungen in den Vordergrund. Die ursprünglich ovalen Kerne werden polymorpher, die Fortsätze kürzer. Neben graziilen bipolaren Spindelzellen sowie pyramiden-artigen Formen sind großleibige, epitheloide Zellen mit wenigen Fortsätzen und zahlreiche Riesenzellen zu beobachten. Die Zellgrenzen der epithelartigen Zellen sind nur schwer erkennbar (Abb. 2b). Das mengenmäßige Verhältnis dieser verschiedenen Zelltypen wechselt von Kultur zu Kultur, auch können zwischen den einzelnen Passagen der gleichen Kultur Unterschiede bestehen. Die beschriebenen Variationen lassen sich nicht mit dem Alter der Kultur korrelieren. Bei einem sehr dicht gewachsenen Zellrasen erscheinen die Zellen in Zügen angeordnet, die den Strukturen in vivo wachsender PNS-Tumoren ähneln (Abb. 3b und 3c).

Die Kulturen lassen sich ohne Schwierigkeit 4-6 Wochen bei Zimmertemperatur aufbewahren, ohne daß degenerati-ve Erscheinungen stark in den Vordergrund treten.



Abb. 3 Subkonfluente Langzeitkultur eines experimentellen Glioms (49. Passage), welches aus bipolaren und multipolaren Zellelementen mit vorwiegend pleomorphen Kernen besteht (a); subkonfluente und konfluente Langzeitkultur eines experimentellen Neurinoms mit graziilen Zellen (b), die in der konfluenten Kultur eine rhythmische Anordnung zeigen (c).
(HE - Fbg. a, b: 120x, c: 48x)

2.2.3. Transplantationstumoren

Im allgemeinen ist die mikroskopische Struktur der nach subkutaner Zellinokulation entstandenen Tumoren mit jener der Primärtumoren vergleichbar. Die Verwendung hoher oder niedriger Passageraten von Tumorzellkulturen spielt für die strukturellen Merkmale der Transplantationsgeschwülste keine Rolle. Mitosen und riesenzell-ähnliche Bildungen sind in diesen sekundären Neoplasien in großer Zahl vorhanden, außerdem werden weit häufiger als bei den Primärtumoren Nekrosen, Hämorrhagien und Zystenbildung beobachtet. Das Wachstum der Transplantationstumoren ist meist infiltrativ, Kapselbildungen sind in der Regel selten nachzuweisen.

Die s.c. Transplantation von Gliomkulturen führt zur Entstehung von schnell wachsenden Tumoren. Die Tumorzellen variieren in Form und Größe und sind wenig differenziert. Allgemein entsteht das Bild eines multiformen Glioblastoms mit zahlreichen Mitosekonfigurationen und vielkernigen Riesenzellen.

Die Inokulation der Neurinomkulturen führte zur Entstehung sehr zellreicher Tumoren, die aus spindeligen Zellen mit langen stäbchenförmigen Kernen bestehen. Die Zellen sind untereinander zu langen Verbänden zusammengefügt und zeigen eine dreidimensionale Durchflechtung. Fischzugartige Formationen, strudel- und wirbelähnliche Zellanordnungen sind wie in den Primärtumoren nachweisbar.

2.3. Elektronenmikroskopische Befunde

2.3.1. Primärtumoren

a) Pleomorphe Gliome

Die Ultrastruktur pleomorpher Gliome der Ratte, induziert durch Resorptivkanzerogene, wurde schon von BENDA et al. (1971), LANTOS (1974) und LANTOS et al. (1976) beschrieben. Bei den hier beschriebenen Tumoren soll nur auf die Besonderheiten des eigenen Materials eingegangen werden. Die Anordnung der Zellen zeigt eine lockere Strukturierung, der extrazelluläre Raum ist erweitert. Die Kerne der einzelnen Zellen sind pleomorph und verhältnismäßig groß. Die Membran des Perikaryon ist nur gelegentlich leicht gefaltet und mit einer dünnen, unregelmäßig dicken Chromatinschicht bedeckt. Die Zellkerne enthalten einen zum Teil auch zwei große, bizarre Nucleoli. Die Tumorzellen sind von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben und von spindeligem Gestalt. Charakteristisch für diese Zellart ist das dichte Filz von Mikrofilamenten im Zytoplasma, in dem auch vereinzelt Mikrotubuli zu sehen sind (Abb. 4b). Unter den reichlich vorhandenen Protoplasmaorganellen sind geschwollene Mitochondrien vom Crista-Typ, rosettenförmig angeordnete Ribosomen und rauhes endoplasmatisches Retikulum (EPR) zu finden. Im extrazellulären Raum sind tentakelartige bis plumpe Mikrovilli zu sehen. An der Zellmembran finden sich häufig sehr kleine Pinozytosebläschen (Abb. 4a). *

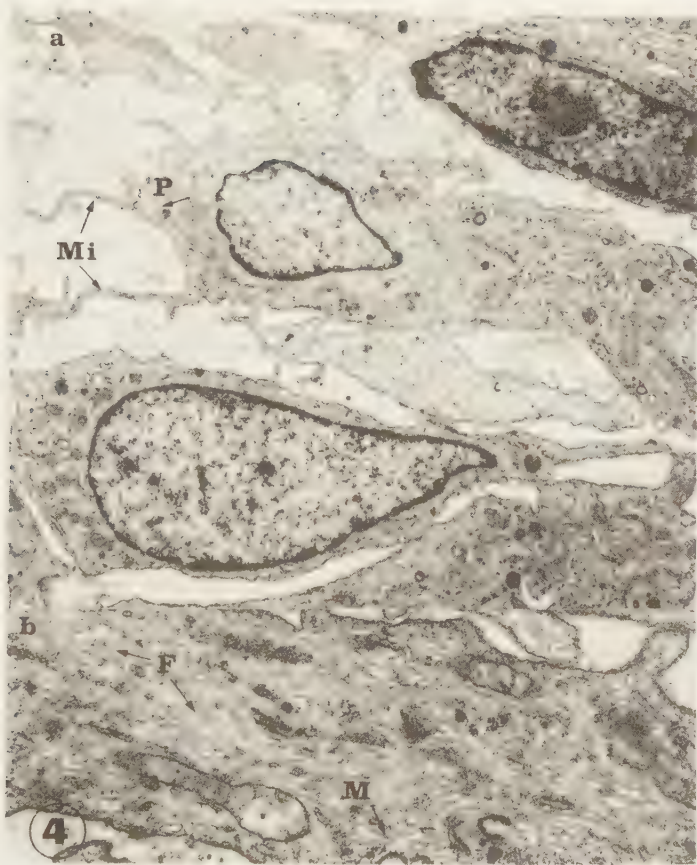


Abb. 4 Ultrastruktur eines in vivo gezüchteten pleomorphen Glioms mit lockerer Strukturierung der Tumorzellen, die kurze und unverzweigte Mikrovilli (Mi) und Pinozytosevesikel (P) zeigen (a); Ausschnitt eines Zellfortsatzes mit intraplasmatischem Netz von Filamenten (F) und einzelnen Mikrotubuli (M) (b).
(a: 6600x, b: 16500x)

b) Pleomorphe Neurinome

Zur Ultrastruktur experimenteller Neurinome ist wiederholt Stellung genommen worden (GEORGSSON et al. 1969; KOESTNER et al. 1971; SWENBERG et al. 1972). Vorliegend wird daher ergänzend lediglich auf die elektronenmikroskopischen Beobachtungen des eigenen Materials eingegangen.

Bei diesen Tumoren sind Areale von zwei verschiedenen Wuchsformen zu unterscheiden. So findet man entsprechend den lichtmikroskopischen Befunden Gebiete mit dicht gefügten länglichen Zellen, die wie in Strömen eng aneinanderliegen und durch Desmosomen miteinander verbunden sind. Daneben gibt es Areale, die einen lockeren Zellverband zeigen. Die Zellen sind hier von Kollagenfibrillen, 50-60 nm breiten Basalmembranen und ungeformten elektronendichten Material umgeben.

Die einzelnen Zellkerne sind sehr unregelmäßig geformt und oft tief eingebuchtet, ein oder mehrere Nucleoli sind zu erkennen. Freie Ribosomen zu Polysomen angeordnet und EPR dominieren im perinukleären Raum. Mikrofilamente und unregelmäßig gestaltete, elektronendichte Einschlüsse sind gelegentlich zu finden. Diese Einschlüsse weisen ab und zu myelinartige Konfigurationen auf. Wie bei den glialen Tumoren sind auch hier kleinste Pinozytosevesikel und Mikrovilli an der Zellmembran zu sehen.

2.3.2. Langzeitkulturen

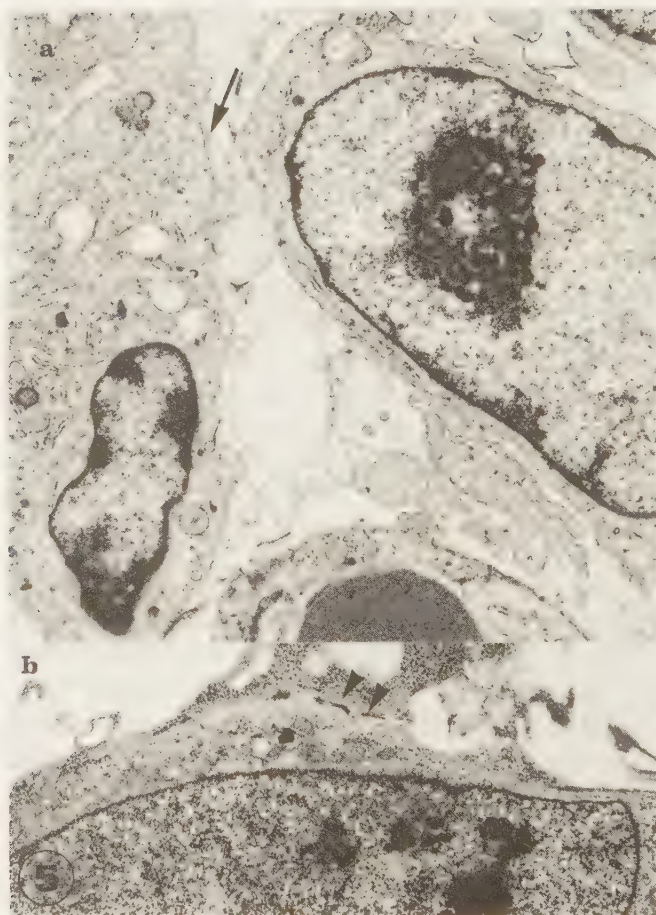
a) Pleomorphe Gliome

Die überwiegende Mehrzahl der Zellen ist von mehr rundlicher Gestalt. Die Kernmembranen zeigen stärkere Einbuchtungen als die der Primärtumoren. Die Zellen sind locker zueinander angeordnet, die Mikrovilli erscheinen lang, tentakelartig und verzahnt. Das Chromatingerüst der Kerne ist locker strukturiert und die meist mehrfach vorhandenen Nucleoli sind gut erkennbar. Die meisten Kerne weisen eine sog. Kernwand-Hyperchromatose auf. Im Zytoplasma sind vermehrt kleine rundliche, elektronendichte Körper zu finden. Die Gestaltung des perinukleären Raums ähnelt den bereits beschriebenen Originaltumoren. Das Netz von Filamenten tritt weniger stark in Erscheinung.

b) Pleomorphe Neurinome

Die Zellen liegen hier ebenfalls locker nebeneinander. Die tentakelartigen Mikrovilli sind lang ausgezogen und gekreuzt, ebenso wie die Zellfortsätze. Bei einzelnen Zellen, die sehr dicht aneinander liegen, besteht eine Verbindung durch Desmosomen (Abb. 5b). Hervorzuheben ist, daß die für den Primärtumor typischen Basalmembranen fehlen.

Die Kerne liegen zentral und sind von rundlicher bis elliptischer Gestalt. Das Profil der Kernmembranen und die Anzahl und Form der Nucleoli gleichen den im ursprünglichen Tumor vorhandenen Strukturen. Sehr oft sind in den Zellen zwei dicht nebeneinanderliegende Zellkerne vorhanden.



Akk. 5 Ultrastruktur eines transplantierten Neurinoms mit Ausbildung von Basalmembranen ($\rightarrow$) (a); Verbindung zweier Neurinomzellen durch Desmosomen von in vitro gezüchteten Tumorzellen ($\blacktriangle\blacktriangle$) (b). (a: 10 000x, b: 17 000x)

In Abweichung zu den Ursprungstumoren zeigen viele der kultivierten Zellen eine Vielzahl von Lysosomen und Mikrofilamenten. Hinsichtlich des Vorkommens und der Gestalt zytoplasmatischer Einschlüsse und Organellen bestehen zwischen Originaltumor und Langzeitkulturen keine nennenswerte Unterschiede.

2.3.3. Transplantationstumoren

Die Wuchsform und Gesamtorganisation der sekundären Tumoren pleomorpher Gliome ist mit den Charakteristika der Primärtumoren übereinstimmend.

Die Transplantation in vitro kultivierter PNS-Geschwülste in vivo führt wieder zur Ausbildung typischer Interzellularelemente, wie ungeformtes elektronendichtes Material, Kollagenfibrillen und Basalmembranen (Abb. 5a). Desmosomen als Zellverbindungen werden vermehrt gefunden. Mitosen sind im Gegensatz zu den kultivierten Zellen selten zu beobachten. Qualität sowie Quantität der Zellorganellen entsprechen den Verhältnissen im Primärtumor.

2.4. Chromosomenanalyse

Die Zellen der isolierten Gliomzelllinie zeigen ein einheitlicheres Wachstumsverhalten als die der Ursprungskultur. Hinsichtlich der Morphologie sind die Zellen der Stammkultur und der isolierten Zelllinie kaum zu unterscheiden. Der Klonbildungswert (plating efficiency) der Zelllinie beträgt 20-30%.

Bei der zytogenetischen Auswertung konnte sowohl für die Zelllinie als auch für die Stammkultur kein einheitlicher Chromosomensatz festgestellt werden. Die Chromosomenzahlen im tetraploiden Bereich waren bei der Zelllinie einheitlicher als bei der Ursprungskultur (Tab. 2). Bei der Zelllinie konnten im diploiden Bereich jedoch keine Mitosen gefunden werden. Einzelheiten sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2: Chromosomenzahl des Originaltumors und der isolierten Zelllinie

	Bereich			
	hypo- diploid	triploid	tetra- ploid	octoploid
	(34-41)	(57-64)	(68-88)	(110-202)
Original- tumor	5	2	13	6
isolierte Zelllinie	-	3	19 ⁺	5

⁺ alle im Bereich 68-78

2.5. Immunologische Untersuchungen

a) S-100-Protein (Immunofluoreszenz)

Von den 22 Tumoren, die in Kultur genommen wurden, zeigen die Zellen aller Kulturen eine für das S-100-Antigen spezifische Fluoreszenz.

Die Zellen aller Kulturen weisen neben der morphologischen Heterogenität auch ein unterschiedliches Fluoreszenzverhalten auf. Hinzu kommt, daß konfluente Kulturen eine schwächere Fluoreszenz als subkonfluente Kulturen aufweisen und etablierte Kulturen im Gegensatz zu Primärkulturen stärker fluoreszieren.

Eine spezifische Fluoreszenz ist sowohl an der Zellmembran als auch im Zytoplasma lokalisiert. Da in den heteromorphen Kulturen verschiedene Zellarten zu finden sind, lassen sich auch in der Fluoreszenzintensität bemerkenswerte Unterschiede feststellen. Am stärksten reagieren die graziilen spindelförmigen bipolaren Zellen (Abb. 6a). Weniger intensiv ist die Fluoreszenz bei den plumpaussehenden, rundlichen unipolaren Zellen und den seltener vorkommenden multipolaren Zellformen. Die bisweilen in Tumorkulturen auftretenden Riesenzellen und epitheloiden, großleibigen Zellen mit einem schleierartig ausgebreiteten Zytoplasma zeigen oft nur eine geringe oder keine spezifische Fluoreszenz (Abb. 6b), ebenso Zellen, die sich in Mitose befinden.

b) Autologe fluoreszierende Antikörper (Immunofluoreszenz)

Der in vitro Nachweis humoraler Antikörper (AK) tumortragender Tiere wurde an zwei pleomorphen Gliomen und zwei pleomorphen Neurinomen durchgeführt. Fluoreszierende Antikörper konnten nur bei den beiden pleomorphen Gliomen nachgewiesen werden, während in den Seren der PNS-tumortragenden Tiere keine fluoreszierenden AK vorhanden waren. Diese Zellen waren nur durch eine unspezifische grünliche Kernfärbung gekennzeichnet. Die Antikörperbindungsstellen scheinen bei den unfixierten Zellen an der Zellmembran lokalisiert zu sein (Abb. 6c).



Abb. 6 Immunofluoreszenznachweis des S-100-Proteins an der Gewebekultur eines pleomorphen Glioms. Stark fluoreszierende Spindelzellen (a); Riesenzelle mit schleierartig ausgebreitetem unspezifisch fluoreszierendem Zytoplasma (b); fluoreszierende tumorspezifische Antikörper im Serum eines gliomtragenden Tieres (autologes System). Bei unfixierten Zellen sind die fluoreszierenden Strukturen an der Zellmembran (c); und bei fixierten Zellen an der Zellmembran und im Zytoplasma lokalisiert (d). (a,c: 200x; b,d: 300x)

Bei den fixierten Zellen zeigen Zellmembran und Zytoplasma fluoreszierende Strukturen (Abb. 6d).

c) Autologe zytotoxische Antikörper (Mikrozytotoxizitätstest)

Der in vitro Nachweis zytotoxischer Antikörper im Serum tumortragender Ratten wurde bei den Seren von vier Tieren durchgeführt. Die Tumoren waren ihrer Klassifikation nach zwei pleomorphe Neurinome und zwei pleomorphe Gliome. Lysierende Antikörper wurden nur in den Seren der gliomtragenden Tiere gefunden. Der Prozentsatz der lysierten Zellen betrug 63 bzw. 71%. Die positiven Seren zeigten noch bei einer Verdünnung von 1:4 einen Titer zytotoxischer Antikörper von 23 bzw. 24%. In der Verdünnungsreihe 1:8 konnte keine Zytotoxizität mehr nachgewiesen werden.

Die Untersuchung zur Klärung einer Kreuzreaktion der vier Seren gegen die einzelnen Tumorzellkulturen untereinander verlief negativ. Die zytotoxischen Eigenschaften der Seren gliomtragender Tiere gingen nach der Absorption mit den entsprechenden Gliomzellen verloren. Demgegenüber konnte keine wesentliche Abnahme der Zytotoxizität gegenüber Gliomzellen nach der Absorption der Seren mit normalen Gliazellen beobachtet werden.

2.6. Nachweis Con A-bindender Rezeptoren

a) Agglutinationstest

Die Agglutination von Zellen durch Con A ist von vielen Faktoren, wie Zelldichte, Con A-Konzentration, Temperatur und Inkubationszeit abhängig, deshalb ist bei der

Durchführung des Tests die Einhaltung konstanter Bedingungen unverzichtbar.

Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich auf Con A-Verdünnung der Stammlösung von 1:32. Unter den anfangs erwähnten Bedingungen (vgl. S. 28) konnte keine Agglutination bei mechanisch abgelösten normalen Hirnzellen festgestellt werden. Trypsinierte normale Zellen weisen einen Agglutinationsgrad auf, der einer Reduktion von Einzelzellen von etwa 75% oder mehr entspricht, während mechanisch abgelöste ebenso wie trypsinierte Tumorzellen eine vergleichbare Agglutinationsstärke von 80% zeigen. Bei den vielkernigen Riesenzellen, die in experimentell induzierten Rattengliomen zu finden sind, konnten keine Agglutinationen beobachtet werden. In den gleichzeitig durchgeführten Kontrollen - den Con A Lösungen wurde Methyl- α -D-manno-pyranosid zugesetzt - agglutinierten weder Tumorzellen noch Normalzellen, obgleich sie mechanisch abgelöst oder trypsiniert wurden. Keine wesentlichen Unterschiede konnten zwischen den normalen Zellkulturen unterschiedlicher Passagen sowie unter den verschiedenen Tumorzellkulturen und den verschiedenen Passagen der gleichen Kultur beobachtet werden.

b) Zytochemische Darstellung

Bei den normalen Gliazellen und Gliomzellen ist ein fast kontinuierliches, dünn verteiltes Präzipitat elektronenmikroskopisch dichten Materials entlang des äußeren Randes der Zytoplasmamembran zu sehen, das nur an wenigen, sehr kleinen Stellen unterbrochen wird (Abb. 7A). Bei vielen Zellen werden, neben gleichmäßig markierten Stellen, Zonen mit mehr "punktförmiger" oder "strichpunktförmiger" Markierung beobachtet. Im allgemeinen sind die Unregelmäßigkeiten in der

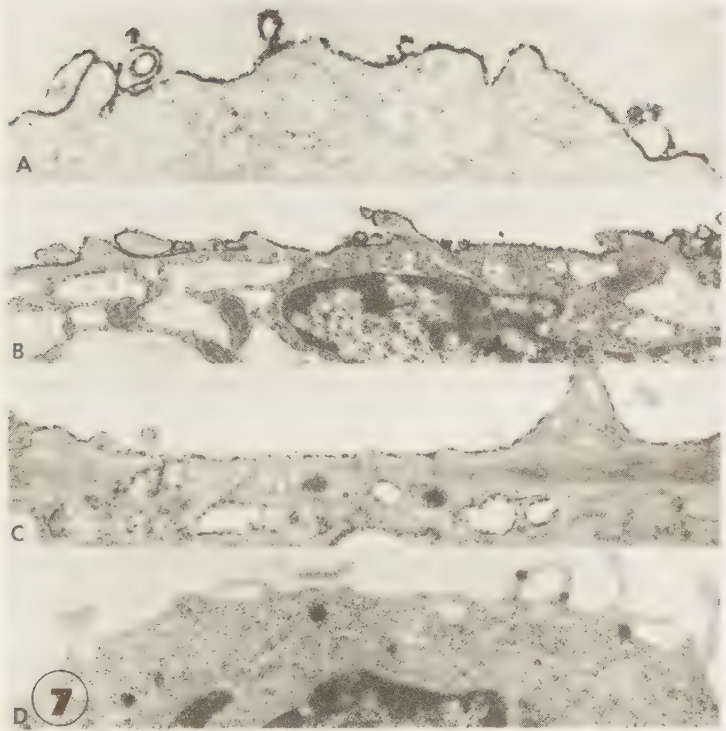


Abb. 7 Ultrazytochemische Darstellung von Con A-Rezeptoren

- (A) Ausschnitt einer Gliomzelle, die vor der Con A-Inkubation in Glutaraldehyd fixiert wurde. Die Zellmembran ist fast kontinuierlich mit elektronenmikroskopisch dichtem Material markiert.
 - (B) Gliomzelle, an der nur wenige Unterbrechungen in der Zelloberflächenmarkierung erkennbar sind.
 - (C) Ausschnitt einer normalen Gliazelle, die eine unregelmäßige und diskontinuierliche Markierung der Zelloberfläche zeigt.
 - (D) Gliomzelle, die zur Kontrolle mit Zusatz von Methyl- α -D-mannopyranosid zu den Stammlösungen inkubiert wurde. Die Zelloberfläche ist nicht markiert.
- (A,D: 21 000x; B: 18 000x; C: 24 000x)

Markierung der Zelloberfläche bei Tumorzellen weniger zahlreich und über kürzere Abschnitte verteilt (Abb. 7B) als bei normalen Gliazellen (Abb. 7C). Normale und neoplastische Zellen zeigen keine Zelloberflächenmarkierung, wenn den Con A- und Peroxidaselösungen Methyl- α -D-mannopyranosid zugesetzt worden war (Abb. 7D).

E. DISKUSSION

1. Zur Natur experimentell induzierter Tumoren

Eine einwandfreie zytologische Charakterisierung lassen nur wenige der durch MNH induzierten Tumoren zu. Lichtmikroskopisch erscheint es oft schwierig zu entscheiden, ob diese Geschwülste neuroektodermalen oder mesodermalen Ursprungs sind. Durch den immunhistochemischen Nachweis des S-100-Antigens kann nicht nur die Frage nach dem histogenetischen Ursprung experimentell induzierter Tumoren geklärt werden, sondern dieses gliaspezifische Protein dient auch zur Kontrolle der Identität von Langzeitkulturen und Ursprungsge-
webe.

Durch die perorale Verabreichung von MNH wurden von uns 34 neurogene Tumoren bei Sprague-Dawley Ratten erzeugt. In Übereinstimmung mit den Befunden einer Reihe von Autoren (BENDA et al. 1971; STAVROU et al. 1971b; WECHSLER et al. 1972; CRAVIOTO et al. 1972) handelt es sich dabei um Neoplasmen neuroektodermalen Ursprungs, da in diesen das S-100 Protein nachgewiesen werden konnte.

Die Fähigkeit der Tumorzellen, dieses spezifische Protein zu synthetisieren, blieb bei den im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Kulturen, selbst nach zweijähriger Kultivierung in vitro, erhalten. Verglichen mit den Beobachtungen von BENDA et al. (1971) konnte bei den von uns kultivierten Tumoren gleichfalls die Beibehaltung ihres neuroektodermalen Charakters festgestellt werden.

Bei einigen Zellen, deren Zytoplasma schleierartig ausgebreitet ist, und deren Fortsätze oft in buschartigen Büscheln auslaufen, konnte keine spezifische Fluoreszenz entdeckt werden. Der Ursprungstumor ist folglich entweder durch neoplastische Alteration zweier verschiedener Zelltypen entstanden oder es handelt sich bei den S-100 negativen Zellen um mesenchymale Elemente, die aus dem Geschwulststroma der Explantate ausgewachsen sind. Herkunft und Natur dieser Zellen bleiben zunächst unklar.

Die Tatsache, daß sowohl normale mesenchymale Zellen als auch Tumorzellen unter den gleichen Bedingungen wachsen können, ist vielfach erwähnt worden (KERSTING, 1961; BENDA et al. 1971; THUST, 1976). Im Gegensatz zu normalen Zellen des Menschen können normale mesenchymale Zellen der Ratte unbegrenzt gezüchtet werden (HAY, 1970). Wenn die verschiedenen Zellarten eine unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeit aufweisen, kann es mit zunehmender Kultivationsdauer zu Selektionsprozessen kommen, indem eine Zellform eine andere überwuchert (THUST, 1976). Die Untersuchung, inwieweit es sich wirklich um Zellen mesenchymalen Ursprungs handelt, kann nur durch Überprüfung zellspezifischer Syntheseleistungen erfolgen, da die Zellen als Adaption an die Verhältnisse in vitro zur Änderung ihrer Morphologie und Struktur neigen. Fortsatzreiche Astrozyten können die Form flach ausgebreiteter Zellen ohne Fortsätze annehmen (POMMERAT, 1958) und mesenchymalen Zellen gleichen (HITCH, 1957). LUMSDEN (1963) spricht von einer "Differenzierung in einen einfacheren Status" und erklärt, daß nach einer bestimmten Zeit in vitro letztlich drei Zelltypen vorkommen: Mesoblastische Zellen, die großbleibigen Fibroblasten mit wenigen, bandartig angeordneten Fortsätzen ähneln, ferner epitheliale Zellen und schließlich Zel-

len von Nervengewebe mit langen fadenförmigen, nicht anastomosierenden Fortsätzen. Von RENKAWEK et al. (1972) wurde diese "Dedifferenzierung" nicht beobachtet. Die Befunde dieser Autorengruppe stützen sich allerdings auf Beobachtungen kürzerer Kultivierungsdauer. Die zunehmende Polymorphie von Gliom- bzw. Neurinomzellen, sowie der Verlust typischer Ausbildung langer Zellfortsätze wurde auch von CRAVIOTO et al. (1972), THUST et al. (1972) und FORNATO und SCHIFFER (1972) festgestellt. Nach MANNUELIDIS (1969) sollen menschliche Glioblastome in Langzeitkulturen ebenfalls epithelialen Habitus annehmen. Derartige Umwandlungen vollziehen sich aber relativ langsam.

2. Isolierung und Etablierung homologer Tumorzelllinien unter Verwendung von conditioniertem Medium.

Einzelne Zellstämme können über Jahre hinweg, andere sogar unbegrenzt in ihren Eigenschaften konstant bleiben (CRAVIOTO et al. 1972; THUST et al. 1972; THUST, 1976). Um das selektive Absterben einer bestimmten Zellform und die Dominanz einer zweiten Zellart zu verhindern, ist die Klonierung von Kulturen in entscheidendem Maße notwendig. Unter Anwendung bestimmter Techniken werden voneinander isoliert liegende Zellen durch Teilung zur Koloniebildung angeregt. Aus jeder Kolonie läßt sich nach mehreren Passagen eine wenigstens in einem bestimmten Merkmal homogene Population von Zellen gewinnen. Das Zwischenschalten mehrerer Passagen ist insofern erforderlich, als Zellen während der Mitose sich abkugeln, abschwimmen und sich an andere Kolonien anlagern können. Diese Eigenschaft der Einzelzellen blieb in der von uns isolierten Zelllinie aus einem Gliom bis zum heutigen Zeit-

punkt, d.h. der 50. - 60. Passage erhalten. Klone, die aus einer Tumorkultur isoliert wurden, unterscheiden sich nicht nur in ihren biochemischen und morphologischen Eigenschaften (THUST, 1971 und 1972) sondern können ebenso hinsichtlich ihrer Malignität verschieden sein (BENDA et al. 1968, 1971; PFEIFFER und WECHSLER, 1972).

Für die Klonierung unserer Gliomkultur verwendeten wir conditioniertes Medium (CM). Die wachstumsstimulierenden Eigenschaften des CM sind bekannt. Während der Inkubation der Stammkultur werden offensichtlich in das Medium Faktoren abgegeben, die die Koloniebildung anregen (CHEN et al. 1975). Die Bildung einer Kolonie aus einer einzelnen Gliomzelle konnte unter gleichen Kultivationsbedingungen bei Verwendung von normalem Nährmedium (BME) von diesen Autoren nicht beobachtet werden. Die Charakterisierung des wachstumsfördernden Faktors ist schwierig. Es ist bekannt, daß Zellpopulationen einer geringen Zelldichte Stoffe wie Pyruvat und verschiedene Aminosäuren in das Nährmedium abgeben und zwar in Mengen, die über die Biosynthesekapazität der Zellen hinausgehen (EAGLE und PIEZ, 1962; HAM, 1972). CHEN et al. konnten aber zeigen, daß diese Substanzen für die initiale Stimulierung der Koloniebildung nicht notwendig sind. Mit zunehmenden Konzentrationszugaben von CM zum Nährmedium steigt auch das Vermögen der Zellen Kolonien zu bilden. Das Molekulargewicht der im CM vorkommenden Wachstumsfaktoren (ob einer oder mehrere ist unbekannt) ist kleiner als 10 000 und größer als 1000. Die Aktivität der Stoffe ist resistent gegen Einfrieren und Auftauen und sogar bis zu einer Temperatur von 86°C stabil (CHEN et al. 1975). Der Gehalt dieser Substanzen im CM hängt von der Zelldichte und Inkubationsdauer der Stammkultur ab.

Durch die Anwendung dieser von CHEN et al. beschriebenen Methode konnten wir bei den von uns isolierten Einzelzellen eines in vitro kultivierten intrakraniellen Glioms ein ähnlich gutes Koloniebildungsvermögen erzielen. In Weiterführung der Untersuchungen verwendeten wir CM zur Wachstumsförderung schlecht wachsender bzw. stationär gewordener Tumorzellkulturen mit durchweg positiven Ergebnissen.

3. Elektronenmikroskopische Befunde bei Primär- bzw. Transplantationstumoren sowie bei den entsprechenden Zellkulturen.

Die dargelegten Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung experimenteller PNS-Tumoren der Ratte und das morphologische Verhalten dieser Tumoren in vivo und in vitro sind den von CRAVIOTO et al. (1972, 1973) erhobenen Befunden vergleichbar. Die Bildung von Basalmembranen oder basalmembranartigem Material an der Oberfläche von Neurinomzellen ist eine Eigenschaft, die experimentellen wie menschlichen PNS-Tumoren gemeinsam ist (GEORGSSON et al. 1969). Die Bildung derartiger Membranen wird nach jüngsten Erkenntnissen als Charakteristikum von Schwannzellen angesehen. Darüberhinaus konnten wir feststellen, daß kultivierte Zellen von Schwannomen die Basalmembranen nicht mehr aufwiesen, wohl aber die entsprechenden Transplantationstumoren. In Anbetracht dieses Phänomens können Spekulationen angestellt werden. Die Eigenschaftsänderungen von kultivierten Tumorzellen müssen offensichtlich nicht endgültig sein, sondern sie können temporär auftreten und als Anpassung an das künstliche Milieu zu verstehen sein (STAVROU et

al. 1977a). Auf die Bedeutung der "Umgebung" weist bereits ZIMMERMANN (1955) hin und bezeichnet die experimentellen Gliomen als "multipotentielle Neoplasmen". Die Ausbildung von Desmosomen als Haftorganellen ist sowohl Primärtumoren als auch Transplantationstumoren und Langzeitkulturen gemeinsam. GEORGSSON et al. stellen diese Organellen als Strukturen des ektodermalen Gewebes dar.

Die reichliche Ausstattung der Tumorzellen mit zytoplasmatischen Organellen ist bei den Neurinomen und pleomorphen Gliomen gleich. Die Anaplasie der Tumoren läßt sich auch elektronenmikroskopisch an Hand der Zell- und Kernpolymorphie, der verschiedenen tiefen Einbuchtungen der Perikaryonmembranen, der großen bizarren Nucleoli sowie der Vielzahl der freien Ribosomen erkennen. Die feinen netzartig verteilten Filamente und die dazwischen verteilten einzelnen Mikrotubuli lassen neoplastisch transformierte, fibrilläre Astrozyten vermuten (BENDA et al. 1971; SIPE et al. 1973; LANTOS et al. 1976), da ähnliche Filamente bei Oligodendrozyten fehlen.

Durch die Änderung von Wachstumsbedingungen, z.B. durch in vivo/in vitro-Wechselpassagen können Tumorzellen zur Bildung spezieller Strukturen stimuliert werden, die den Zellen der Ursprungstumoren vergleichbar sind. Permanente Zellstämme können also die charakteristischen Eigenschaften der Primärtumoren beibehalten. Die zunehmende Polymorphie in vitro kultivierter Zellen und der Verlust typischer Zellformen und Fortsatzbildungen werden von den Kultivationsbedingungen beeinflusst. Daraus ergibt sich, daß zur Identifizierung von Langzeitkulturen der Vergleich verlässlicher in vitro/in vivo-Merkmale notwendig ist.

4. Zytogenetische Befunde

Die isolierte Zelllinie zeigte im tetraploiden Bereich sehr viel einheitlichere Chromosomenzahlen als die permanente Gliomstammlinie (s.S. 46, Tabelle 2). Eine Tetraploidisierung entsteht meist nach längerer Kultivierung von Zellen. Für diese in vitro Veränderungen des Chromosomensatzes kommen eine Reihe von Milieufaktoren in Betracht, die von THUST (1971, 1972) bereits erörtert wurden. In den meisten Fällen können Stammlinien von kultivierten Tumorzellen nach Endoreduplikationen tetraploid werden und nach Chromosomenverlusten kann ein relativer Gleichgewichtszustand im tri- bis tetraploiden Bereich eintreten, welches als "Ising-Effekt" bezeichnet wird. Bei der untersuchten Zelllinie unseres Materials ist die Tetraploidisierung wahrscheinlich ebenfalls infolge langzeitiger Kultivierung entstanden, da in der Stammkultur Mitosen mit hypodiploiden Chromosomensatz und bei der Zelllinie auch Chromosomenzahlen im triploiden Bereich gefunden werden konnten (ZANKL, 1977).

5. Concanavalin A bindende Rezeptoren

Die Ergebnisse unserer Agglutinationsversuche stimmen mit einer Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Befunde überein (NICOLSON, 1974). Keine signifikanten Unterschiede zwischen normalen und Tumorzellen wurden von GLIMELIUS et al. (1974) mitgeteilt. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen sollen normale wie transformierte Zellen in Gegenwart von Con A in gleicher Stärke agglutininieren. Es ist allerdings zu betonen, daß diese Autoren niedrigere Con A Konzentrationen und

kürzere Inkubationszeiten als wir verwendet haben. Die Ursachen für die Unterschiede zwischen den Befunden unserer Versuche und den von GLIMELIUS beschriebenen Beobachtungen sind dennoch unklar. Es wäre möglich, daß die verschiedenen Resultate zellspezifisch oder speziesbedingt sind. Unsere Studien basieren auf Rattenzellen im Gegensatz zu GLIMELIUS et al., die menschliche Zellen untersucht hatten. Andererseits könnte eine von diesen Autoren vor der Inkubation mit Con A erfolgte Behandlung der Zellen mit PBS-A oder EDTA dafür verantwortlich sein.

Die von uns im Elektronenmikroskop beobachtete unregelmäßige Verteilung des Reaktionsproduktes an der Oberfläche normaler und transformierter Gliazellen (vgl. auch ANZIL et al. 1977) stimmt weitgehend mit den Befunden anderer Autoren überein, die ebenfalls mit normalen und transformierten Zellen arbeiteten (BRETTON et al. 1972; GARRIDO et al. 1974; TEMMINK et al. 1975). BRETTON et al. (1972) beschrieben die ultrastrukturelle Lokalisation von Con A bindenden Rezeptoren bei normalen und SV₄₀-transformierten Rattenzellen, stellten unterschiedliche Befunde dar, ebenso wie MARTINEZ-PALOMO et al. (1972), ROWLATT et al. (1973) und ROTH et al. (1975).

In diesem Zusammenhang sei jedoch darauf hingewiesen, daß in keiner der ultrastrukturellen Untersuchungen dieser Art gliale Zellen verwendet wurden. Unter Berücksichtigung dieses Umstandes kann ein Vergleich zwischen den eigenen Resultaten und den in der Literatur angegebenen Befunden nur in begrenztem Umfang erfolgen. Die diskontinuierliche Verteilung in der Con A-Markierung erscheint nach den vorliegenden Befunden weder ein Charakteristikum für Gliomzellen noch für

Gliazellen neugeborener Ratten zu sein. Inwieweit normale Gliazellen erwachsener Tiere gleichfalls ein diskontinuierliches Markierungsmuster aufweisen, bedarf noch der Klärung. Zunächst kann mit Sicherheit gesagt werden, daß sowohl normale als auch transformierte Gliazellen von Ratten ein im Grunde vergleichbares Markierungsmuster aufweisen, und daß die Unregelmäßigkeiten im Präzipitatbild bei normalen und Tumorzellen ähnlich sind, wobei allerdings bei normalen Gliazellen der Con A-Niederschlag gleichmäßiger verteilt ist als bei Gliomzellen. Insgesamt ist darauf hinzuweisen, daß die Verteilung der Con A-Rezeptoren bei normalen und transformierten Gliazellen der Ratte in keiner Korrelation zu den beschriebenen Agglutinationsresultaten der gleichen Zellen steht. DE PETRIS et al. (1973) und ROOS und THEMMINK (1975) fanden bei der Untersuchung Con A bindender Rezeptoren bei verschiedenen Zellpopulationen und ihren transformierten Gegenstücken ähnliche Ergebnisse. Daraus folgt, daß das unregelmäßige verteilte, zellgebundene Con A keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Lektin-induzierte Agglutinierbarkeit der Zellen hat. Dieser Folgerung können wir uns auf Grund der Beurteilung unserer Ergebnisse anschließen.

6. Immunologische Befunde

In unseren Versuchen hat sich gezeigt, daß zytotoxische und fluoreszierende Antikörper in den Seren gliomtragender Tiere, nicht aber in denen von Ratten mit PNS-Tumoren nachweisbar sind. TOH und GULI (1974) haben die Seren von 26 Tieren mit ÄNH induzierten Astrozytomen, Oligodendrogliomen, Mischgliomen und Schwannomen getestet. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurden

keine Antikörper im Serum schwannomtragender Ratten gefunden. Die Autoren stellten die Befunde dem histologischen Nachweis lymphozytärer Tumordinfiltrationen gegenüber und fanden bei den Geschwülsten des peripheren Nervensystems ebenfalls keine Reaktionen.

Histologisch waren auch bei unseren experimentell induzierten Gliomen solche Infiltrate zu finden (Abb. 1a). Bei der immunologischen Untersuchung der Natur und Bedeutung der mononukleären Infiltrationen bei spontanen und experimentellen Gliomen konnten STAVROU et al. (1977) darüberhinaus nachweisen, daß es sich bei über der Hälfte der beteiligten Lymphozyten um Zellen der T-Reihe handelt. Auf Grund ihrer Untersuchungen kommen sie weiterhin zu der Annahme, daß Oligodendrogliome im Gegensatz zu den anderen Gliomarten entweder keine spezifischen Antigene besitzen, oder - da diese Tumoren zur Verschleimung neigen - Sialomucine die Oberflächenantigene der Tumorzellmembranen maskieren.

Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen und den von TOH und GULI beschriebenen Befunden stehen die Ergebnisse der Untersuchungen von KORNBLITH et al. (1974). Sie fanden im Serum von Patienten mit Schwannomen zytotoxische Antikörper und verweisen dabei auf die Arbeit von PFEIFFER et al. (1972), da der Nachweis des S-100-Antigens in peripheren Tumoren wie den untersuchten Geschwülsten des Nervus cochlearis (acusticus) auf die enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen Schwann- und Gliazellen schließen läßt.

Das Fehlen einer zytotoxischen Aktivität in den Seren schwannomtragender Ratten unseres Materials könnte mit dem wiederholten Auftauen und Einfrieren sowie mit der langen Lagerung (1 Jahr) bei -20°C in Zusammenhang stehen.

Es ist bekannt, daß die zellvermittelte Immunität bei der Tumorabwehr eine bedeutendere Rolle spielt als die humoralen Antikörper. Da die Zytotoxizität der Seren gliomtragender Tiere jedoch 60-70% beträgt, erhebt sich die Frage, warum diese Tiere dann nicht imstande sind, das Tumorstadium zu beeinflussen. Eine Hypothese über die humoralen Immunvorgänge bei tumortragenden Wirten finden wir bei THOMSON (1975). Am Anfang ist der Tumor klein und somit die Anzahl von Geschwulstzellen gering. Das Immunsystem des Wirtes muß sich mit einer geringen Menge eines schwach immunogenen, tumorassoziierten Antigens (TAA) auseinandersetzen, d.h. unter anderem werden auch wenig reaktive Immunzellen stimuliert. Die Immunantwort ist schwach, bzw. der Nachweis humoraler Antikörper oder sensibilisierter Immunzellen negativ. Dann wird die Geschwulst größer, dem tumortragenden Tier stehen mehr TAA zur Entwicklung einer Immunantwort zur Verfügung. Bis der Wirt aber eine voll entwickelte d.h. "belastbare" Immunität erreicht hat, werden die Tumorantigene weiter akkumuliert. Die zirkulierenden tumorspezifischen Immunglobuline blockieren zwar in der Mikroumgebung des Tumors diese Antigene, die Reaktion bleibt jedoch ohne morphologisch faßbare Folgen für die Tumorzellen. Es kommt zu einer partiellen oder kompletten "Maskierung" der Oberflächenantigene und zur schrankenlosen Vermehrung der Tumorzellen ("Enhancement-Phänomen", HELLSTRÖM et al. 1971). Der Wirt entwickelt also eine humorale Immunität, ist aber dennoch nicht fähig, die große Zellpopulation von Tumorzellen auszurotten.

Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen der von BALDWIN et al. (1973) beschriebenen Untersuchungen.

Bei diesen fanden sich im Serum hepatomtragender Tiere zunächst keine oder kaum nachweisbare Spuren zirkulierender Antikörper, wohl aber nach der Exzision des Tumors. Das vom Tumor freigesetzte Antigen wird also offenbar durch die im Serum vorhandenen Antikörper blockiert, die dann nach Entfernung des Antigens bzw. des Tumors wieder im Blut nachweisbar sind.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Sprague-Dawley-Ratten wurden durch Applikation des neuroonkogenen N-Methyl-N-nitrosoharnstoff Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems erzeugt. Von den induzierten Neoplasmen wurden Primärkulturen angelegt und aus diesen durch wiederholtes Passagieren vier permanente Kulturen etabliert. Die Primärexplantate sowie die Zellen der Langzeitkulturen wurden durch den Nachweis des S-100 Proteins charakterisiert. Mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz und des Mikrozytotoxizitätstests wurden zirkulierende Antikörper im autologen Serum nachgewiesen. Die Zellen der etablierten Kulturen wurden Sprague-Dawley-Ratten subkutan inokuliert, die daraus entstandenen Transplantationstumoren, sowie die Primärtumoren und die entsprechenden Langzeitkulturen wurden licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Bei den Tumorkulturen wurden unter Anwendung zytochemischer Methoden Concanavalin-A-bindende Rezeptoren untersucht.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Zellen der Primärtumoren, der Langzeitkulturen und der Transplantationstumoren zeigen in morphologischer Hinsicht zahlreiche Gemeinsamkeiten, mit Ausnahme der Bildung von Basalmembranen bei PNS-Tumoren. Bei den Zellkulturen der zuletzt genannten Geschwülste fehlen solche Strukturen.
2. Aus experimentellen Gliomen der Ratte können klonierungsfähige, permanente Zellstämme etabliert werden. Aus einer solchen etablierten Gliomkultur wurde eine permanente Zelllinie isoliert, die als Testsystem mit wohldefinierten Eigenschaften empfohlen werden kann.

3. Mit Hilfe immunologischer Techniken wurde gezeigt, daß alle experimentellen Tumoren das S-100 Protein enthalten. Fluoreszierende und zytotoxische Antikörper im Serum tumortragender Ratten konnten nur bei Tieren mit Gliomen nachgewiesen werden.
4. Concanavalin-A-bindende Rezeptoren wurden zytochemisch bei Glia- und Gliomzellen gefunden. Normale Gliazellen neugeborener Ratten agglutinieren im Gegensatz zu Gliomzellen bei Anwesenheit von Con-A nicht, sondern nur, wenn zuvor eine Behandlung mit Proteasen erfolgte. Hinsichtlich der ultrastrukturellen Verteilung von Con A-Rezeptoren bestehen zwischen Gliazellen neugeborener Ratten und Gliomzellen morphologisch quantitativ faßbare Unterschiede.

SUMMARY

Tumours of the central and peripheral nervous system were induced in Sprague-Dawley rats by application of neurooncogenic 1-methyl-1-nitrosourea. Primary cultures were grown from the induced neoplasms and from these four permanent cultures were established after repeated passages. The primary cultures as well as the long-term cultures were characterized by the demonstration of the S-100 protein. Circulating antibodies in autologous serum were shown by indirect immunofluorescence and microcytotoxicity test. Cells from the established cultures were inoculated subcutaneously in Sprague-Dawley rats. The transplanted tumours as well as the primary tumours and the appropriate long term cultures were investigated by light and electron microscope. Concanavalin A receptors were investigated with the use of cytochemical methods in the tumour cultures.

The results are the following:

1. The cells of primary tumours, long-term cultures and transplanted tumours show numerous similarities from a morphological viewpoint with the exception of basement membrane-formations in the PNS tumours which is lacking in cell cultures of these neoplasms.
2. Clons are obtained from permanent cell strains established from experimental gliomas of rats. A permanent cell line was isolated from such an established glioma culture which can be recommended as a test system with well defined properties.

3. With immunological techniques it is shown that all experimental tumours synthesize the S-100 protein. Fluorescent and cytotoxic antibodies in the serum of tumour bearing rats can only be demonstrated in animals with gliomas.
4. Concanavalin A receptors are found cytochemically in glia and glioma cells. Normal glia cells from new born rats, contrary to glioma cells, do not agglutinate in the presence of Con A, but only after previous treatment with protease. With respect to the distribution of Con A receptors there exist quantitative detectable differences between glia cells of new born rats and glioma cells.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung durch die DFG (auf SFB 51/A-19) sowie durch den C. BOHNEWAND - Fonds der Universität München durchgeführt.

G. LITERATURVERZEICHNIS

AMOS, D.B., H. BASHIR, W. BOYLE, M. McQUEEN and
A. TIILIKAINEN:

A simple microcytotoxicity test.

Transplantation 7, 220-223 (1969).

ANZIL, A.P., D. STAVROU, K. BLINZINGER and
U. OSTERKAMP:

Interactions of Concanavalin A with cell surfaces of
normal and tumor rat glial cells monitored by agglu-
tination and cytochemical detection.

European J. Cancer (in press) 1977.

BAILEY, P. and H. CUSHING:

A classification of the tumors of the glioma group
on a histogenic basis with a correlated study of pro-
gnosis.

Philadelphia: Lippincott Co. 1926.

BALDWIN, R.W., J.S. EMBLETON, P. JONES and S. LANG-
MAN:

Cell-mediated and humoral immune reactions to human
tumours.

Int. J. Cancer 12, 73-83 (1973).

BENDA, P.:

Protéine S-100 et tumeurs cérébrales humaines.

Rev. Neurol. 118, 368-372 (1968a).

BENDA, P., J. LIGHTBODY, G. SATO, L. LEVINE and
W.H. SWEET:

A differentiated rat glial cell strain in tissue
culture.

Science 161, 370-371 (1968).

BENDA, P., K. SOMEDA, J. MESSER and W.H. SWEET:
Morphological and immunochemical studies of rat glial
tumors and clonal strains propagated in culture.
J. Neurosurg. 34, 310-323 (1971).

BERNHARD, W. and S. AVRAMEAS:
Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate
components by means of Concanavalin A.
Exp. Cell Res. 64, 232 (1971).

BRETTON, R., R. WICKER and W. BERNARD:
Ultrastructural localization of Concanavalin A recep-
tors in normal and SV₄₀-transformed hamster and rat
cells.
Int. J. Cancer 10, 397 (1972).

BUCKLEY, R.C.:
Tissue culture studies of glioblastoma multiforme.
Amer. J. Path. 5, 467 (1929).

BURGER, M.M.:
Surface changes in transformed cells detected by lec-
tins.
Federation Proc. 32, 91-101 (1973).

CHEN, T.T., J. MEALEY and R.L. CAMPBELL:
Quantitative cloning of malignant human glioma cells
by conditioned medium.
J. nat. Cancer Inst. 55, 1275-1280 (1975).

COONS, A.H.:
The application of fluorescent antibodies to the
study of naturally occurring antibodies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 658-662 (1957).

CRAVIOTO, H. and R. LOCKWOOD:

The behaviour of acoustic neuroma in tissue culture.

Acta neuropath. (Berl.) 12, 141-157 (1969).

CRAVIOTO, H., L. PALEKAR, E. WEISS and K. BENNETT:

Experimental neurinoma in tissue culture.

Acta neuropath. (Berl.) 21, 154-164 (1972).

CRAVIOTO, H., J.F. WEISS, H.H. GOEBEL and J. RANSO-
HOFF:

Biological characteristics of peripheral nerve tu-
mors induced with ethylnitrosourea.

Acta neuropath. (Berl.) 23, 265-280 (1973).

DENLINGER, R.H., A. KOESTNER and J.A. SWENBERG:

An experimental model for selective production of
neoplasms of the peripheral nervous system.

Acta neuropath. (Berl.) 23, 219-228 (1973).

DRUCKREY, H., S. IVANKOVIC und R. PREUSSMANN:

Selektive Erzeugung von Hirntumoren bei Ratten durch
Methylnitrosoharnstoff.

Naturwissenschaften 51, 144-146 (1964).

DRUCKREY, H., S. IVANKOVIC und R. PREUSSMANN:

Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und
Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-N-nitrosoharn-
stoff.

Z. Krebsforsch. 66, 389-408 (1965).

DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC und D.
SCHMÄHL:

Organotrope karzinogene Wirkungen bei 65 verschiede-
nen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten.

Z. Krebsforsch. 69, 103-201 (1967).

EAGLE, H. and K. PIEZ:

The population-dependent requirement by cultured mammalian cells for metabolites which they can synthesize.

J. Exp. Med. 116, 29-43 (1962).

EDELMAN, G.M., B.A. CUNNINGHAM, G.N. REEKE, Jr., J.W. BECKER, M.J. WAXDAL and J.L. WANG:

The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2580-2584 (1972).

ELLING, H.:

Experimentelle Untersuchungen zur Antigenität eines chemisch induzierten Astrozytoms der Ratte.

Vet. Med. Dissertation (München) 1977.

FISCHER, A.:

Observations on the division of Sarcoma cells in vitro.

J. Cancer Res. 9, 71-84 (1925).

FORNATO, L. and D. SCHIFFER:

In vitro culture observations on Neurinoma induced experimentally in the rat by ethylnitrosourea.

Acta neuropath. 20, 199-206 (1972).

GARRIDO, J., M.-J. BURGLIN, D. SAMOLYK, R. WICKER and W. BERNHARD:

Ultrastructural comparison between the distribution of Concanavalin A and wheat germ agglutinin cell surface receptors of normal and transformed hamster and rat cell lines.

Cancer Res. 34, 230 (1974).

GEORGSSON, G., W. WESSEL und C. THOMAS:
Zur Feinstruktur experimenteller Nerventumoren.
Z. Krebsforsch. 72, 12-23 (1969).

GLIMELIUS, B., B. WESTERMARK and J. PONTEN:
Agglutination of normal and neoplastic human cells
by Concanavalin A and Ricinus Communis Agglutinin.
Int. J. Cancer 14, 314-325 (1974).

GRAHAM, R.C. and M.J. KARNOVSKY:
The early stage of absorption of injected horse-
radish peroxidase in the proximal tubules of mouse
kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new tech-
nique.
J. Histochem. Cytochem. 14, 291-302 (1966).

HAGLID, K.G., C.-A. CARLSSON and C.-A. THULIN:
Lactate dehydrogenase isoenzymes and proteins in
human gliomas.
Neurochirurgia (Stuttg.) 13, 19-28 (1970).

HAGLID, K.G. and C.-A. CARLSSON:
An immunological study of some human brain tumors con-
cerning the brain specific protein S-100.
Neurochirurgia (Stuttg.) 14, 24-27 (1971).

HAGLID, K.G. and D. STAVROU:
Water-soluble and pentanol-extractable proteins in
human brain normal tissue and human brain tumours,
with special reference to S-100 protein.
J. Neurochem. 20, 1523-1532 (1973).

HALLE, W.:
Zell- und Gewebezüchtung bei Tieren.
In: Bausteine der modernen Physiologie 3. Gustav
Fischer Verlag, Stuttgart-New York 1976 pp. 69-71.

HAM, R.G.:

Cloning of mammalian cells.

Methods Cell Physiol. 5, 37-74 (1972).

HARRISON, R.G.:

Observations on the living developing nerve fiber.

Anat. Rec. 1, 116 (1908).

HAY, R.J.:

Cell strains senescence in vitro: cell culture anomaly or an expression of a fundamental inability of normal cells to survive and proliferate.

In: Holeckova, E. and V.J. Cristofalo: Aging in cell and tissue culture. Plenum Press, New York-London, 1970, pp. 7-24.

HELLSTRÖM, J., H.O. SJÖGREN, G. WARNER and K.E.

HELLSTRÖM:

Blocking of cell-mediated tumor immunity by sera from patients with growing neoplasms.

Int. J. Cancer 7, 226-237 (1971).

HILD, W.:

Observations on neurons and neuroglia from the area of the mesencephalic fifth nucleus of the cat in vitro.

Z. Zellforsch. 47, 127-146 (1957).

IVANKOVIC, S.:

Selektive Erzeugung von Geschwülsten im Gehirn und Nervensystem.

In: H.E. BOCK (ed.): Krebsforschung und Krebsbekämpfung Bd. VI, pp. 97-101. München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1967.

JÄNISCH, W. und D. SCHREIBER:

Experimentelle Geschwülste des Zentralnervensystems.

Jena: Fischer 1969.

JÄNISCH, W., D. SCHREIBER, R. WARZOK und G. OSSKE:
Frühstadien von Geschwülsten des Zentralnervensystems.
Experimentell-morphologische Untersuchung.
Exp. Path. 4, 60-68 (1970).

KERSTING, G.:
Die Gewebszüchtung menschlicher Hirngeschwülste.
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1961.

KLEIN, G., M. HAUPTFELD and V. HAUPTFELD:
Evidence for a third, Ir-associated histocompatibility
region in the H-2 complex of the mouse.
Immunogenetics 1, 45-46 (1974).

KOESTNER, A., J.A. SWENBERG and W. WECHSLER:
Transplacental production with ethylnitrosourea of
neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley
rats.
Amer. J. Path. 63, 37-50 (1971).

KORNBLITH, P.L., F.C. DOHAN, Jr., W.C. WOOD and B.O.
WHITMAN:
Human astrocytoma: Serum-mediated immunologic re-
sponse.
Cancer 33, 1512-1519 (1974).

KREDEL, F.E.:
Tissue culture of intracranial tumors with notion on
the meningiomas.
Amer. J. Path. 4, 337 (1928).

LANTOS, P.L.:
An electron microscope study of reacting astrocytes
in gliomas induced by n-ethyl-n-nitrosourea in rats.
Acta neuropath. (Berl.) 30, 175-181 (1974).

LANTOS, P.L., J.P. ROTCOO and C.J. SKIDMORE:
Studies of the morphology and tumorigenicity of
experimental brain tumours in tissue culture.
Br. J. exp. Path. 57, 95-104 (1976).

LUMSDEN, C.E.:
The study of tissue culture of tumours of the ner-
vous system.
In: Russel, D.S. and L.J. Rubinstein: Pathology of
tumours of the nervous system. Arnold Ltd., London
1963, pp. 334-430.

MALLUCCI, L.:
Binding of Concanavalin A to normal and transformed
cells as detected by immunofluorescence.
Nature New Biology 233, 241-244 (1971).

MANUELIDIS, E.E.:
Long-term lines of tissue culture of intracranial
tumors.
J. Neurosurg. 22, 368-373 (1965).

MANUELIDIS, E.E.:
Experiments with tissue culture and heterologous trans-
plantation of tumors.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 409-431 (1969).

MARCUS, P.I., S.J. CIECIURA and T.T. PUCK:
Clonal growth in vitro of epithelial cells from nor-
mal human tissues.
J. exp. Med. 104, 615 (1956).

MARTINEZ-PALOMO, A., R. WICKER and W. BERNHARD:
Ultrastructural detection of Concanavalin surface
receptors in normal and in Polyoma-transformed cells.
Int. J. Cancer 9, 676-684 (1972).

MENNEL, H.D. und K.J. ZÜLCH:

Die Morphologie maligner Tumoren des peripheren Nervensystems.

Zbl. Neurochir. 32, 11-24 (1971).

MOORE, B.W.:

A soluble protein characteristic of the nervous system.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 739-744 (1965).

MOORE, B.W.:

Acid proteins.

In: Handbook of neurochemistry. Vol. 1, pp 93-99

(Plenum Press, New York, 1969).

MOORE, B.W. and D. MCGREGOR:

Chromatographic and electrophoretic fractionation of soluble proteins of brain and liver.

J. biol. Chem. 240, 1647-1653 (1965).

MOSCONA, A.A.:

Embryonic and neoplastic cell surfaces: availability of receptors for Concanavalin A and wheat germ agglutinin.

Science 171, 905-907 (1971).

MOSCONA, H. and A. MOSCONA:

The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo.

J. Anat. 86, 287 (1952).

MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G.WITTMANN:

Virologische Arbeitsmethoden, Band I.

Gustav Fischer Verlag - Stuttgart - 1974.

NICOLSON, G.L.:

Difference in topology of normal and tumor cell membranes shown by different surface distributions of ferritin-conjugated Concanavalin A.

Nature New Biology 233, 244-246 (1971).

NICOLSON, G.L.:

The interactions of lectins with animal cell surfaces.

Int. Rev. Cytol. 39, 89 (1974).

PEES, H.W.:

Der zelluläre zytotoxische Test in der Tumorummunologie.

Klin. Wschr. 53, 1-6 (1975).

PETRIS, de, S., M.C. RAFF and L. MALLUCCI:

Ligand-induced redistribution of Concanavalin A receptors on normal, trypsinized and transformed fibroblasts.

Nature New Biology 244, 275-278 (1973).

PFEIFFER, S.E., H.R. HERSCHMAN, J. LIGHTBODY and G. SATO:

Synthesis by a clonal line of rat glial cells of a protein unique to the nervous system.

J. cell. Physiol. 75, 329-340 (1970).

PFEIFFER, S.E. and W. WECHSLER:

Isolation of clones from a chemically induced tumor of the peripheral nervous system of the rat.

Naturwissenschaften 11, 518-519 (1972).

PFEIFFER, S.E., P.L. KORNBLITH, H.L. CARES, J. SEALS and L. LEVINE:

S-100 protein in human acoustic neurinomas.

Brain Res. 41, 187-193 (1972).

PINKUS, H.:

Pure culture of human tumor cells.

Michigan Univ. Hosp. Bull. 1, 41-50 (1935).

POMERAT, C.M.:

Functional concepts based on tissue culture studies of neuroglia cells.

In: Windle (WF) ed.: Biology of Neuroglia.

Springfield, Illinois, Charles C. Thomas 1958 pp. 162-175.

RENKAWEK, K., H. KROH and Z. KRASNICKA:

Experimental gliomas cultured in vitro.

Morphological and histochemical study.

Z. Krebsforsch. 77, 247-256 (1972).

ROOS, E. and J.H.M. TEMMINK:

Cytochemical comparison between wheat germ agglutinin and Concanavalin A bound to mouse fibroblasts in vitro.

Exp. Cell Research 94, 140-146 (1975).

ROTH, J.:

Concanavalin A receptors on normal rat liver cells, on rat liver cells in vivo transformed by diethylnitrosamine and on Zajdela ascites hepatoma cells of the rat: morphokinetic analysis of cell surface dynamics.

Exp. Path. 11, 291-304 (1975).

ROTH, J., G. NEUPERT and F. BOLCK:

Concanavalin A receptors in the plasma membrane of rat liver cells: comparative electron microscopic studies on normal cells and on cells in vivo transformed by diethylnitrosamine.

Exp. Path. 10, 143 (1975).

ROTH, J. and M. BINDER:

Concanavalin A receptors and intermembraneous particles. Existence of a correlative mobility.

Exp. Path. 12, 109-116 (1976).

ROWLATT, C., R. WICKER and W. BERNHARD:

Ultrastructural distribution of Concanavalin A receptors on hamster embryo and adenovirus tumor cell cultures.

Int. J. Cancer 11, 314 (1973).

SANO, K., F. SATOH and H. CHIGASAKI:

Tissue culture of glioma.

In: Nakai, J.: Morphology of Neuroglia.

Igaku Shoin Ltd., Japan 1961, Chapt. VI, pp. 133-150.

SCHMIDEK, H.H., S.L. NIELSEN, A.L. SCHILLER and

J. MESSER:

Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea.

J. Neurosurg. 34, 335-340 (1971).

SCHUBERT, D., S. HEINEMANN, W. CALISLE, H. TARIKAS,

B. KIMES, J. PATRICK, J.H. STEINBACH, W. CULP and

B.L. BRANDL:

Clonal cell lines from the rat central nervous system.

Nature 249, 224-227 (1974).

SIPE, J.C., M.M. HERMANN and L.J. RUBINSTEIN:

Electron microscopic observations on human glioblastomas and astrocytomas maintained in organ culture systems.

Am. J. Path. 73, 589-600 (1973).

SJÖGREN, H.O., J. HELLSTRÖM, S.C. BANSAT, G.A.
WARNER and K.E. HELLSTRÖM:

Elution of "blocking factors" from human tumors
capable of abrogating tumor-cell destruction by
specifically immune lymphocytes.

Int. J. Cancer 9, 274 (1972).

SPERLING, K. and R. WIESNER:

A rapid banding technique for routine use in human
and comparative cytogenetics.

Humangenetik 15, 349-353 (1972)

STAVROU, D.:

Morphologische und enzymhistochemische Untersuchungen
an experimentellen PNS-Tumoren der Ratte.

Arch. Geschwulstforsch. 34, 297-308 (1969).

STAVROU, D. und E. DAHME:

Beitrag zur Enzymhistochemie experimentell induzier-
ter Hirntumoren beim Kaninchen.

Verhd. Dtsch. Ges. Path. 53, 548-553 (1969).

STAVROU, D.:

Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experi-
menteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte.
I. Morphologische Befunde.

Acta neuropath. (Berl.) 15, 220-230 (1970).

STAVROU, D.:

Zur vergleichbaren Pathologie der Tumoren des Nerven-
systems.

Zbl. Vet. Med. A 18, 585-646 (1971a).

STAVROU, D., K.G. HAGLID and W. WEIDENBACH:

The brain specific proteins S-100 and 14.3.2. in ex-
perimental brain tumors of the rat.

Z. ges. exp. Med. 156, 237-242 (1971).

STAVROU, D. und K.G. HAGLID:

Morphologische und immunologische Untersuchungen zur Histogenese experimenteller Hirntumoren.

J. neurol. Sci. 20, 39-50 (1973a).

STAVROU, D. and K.G. HAGLID:

Water soluble proteins from rat brain and from experimental tumors of rat nervous system.

Z. Krebsforsch. 79, 249-254 (1973b).

STAVROU, D., K.G. HAGLID and L. RÖNNBÄCK:

The S-100 protein in rat brain and in methylnitrosourea-induced tumors of the rat nervous system.

Europ. Neurol. 10, 168-178 (1973).

STAVROU, D., K.G. HAGLID, H. ZANKL und K.D. ZANG:

Immunhistochemischer Nachweis des hirnspezifischen S-100-Proteins bei experimentellen Hirntumoren.

Z. Krebsforsch. 82, 75-82 (1974).

STAVROU, D., A.P. ANZIL, W. WEIDENBACH and H. RODT:

Immunofluorescence study of lymphocytic infiltration in gliomas: identification of T-lymphocytes.

J. neurol. Sci. 1977 (in press).

STAVROU, D., B. SCHRÖDER, U. OSTERKAMP und E. DAHME:

Beitrag zur Morphologie experimenteller Tumoren des peripheren Nervensystems unter besonderer Berücksichtigung ultrastruktureller Befunde.

Tierärztl. Wschr. (Berl. Münch.) 90, 109-113 (1977).

STEWART, J.A.:

Tissue specific brain S-100. A demonstration of multiple proteins.

Biochim. Biophys. Acta 263, 178-192 (1972).

SWENBERG, J.A., A. KOESTNER and W. WECHSLER:
The induction of tumors of the nervous system with
intravenous methylnitrosourea.
Lab. Invest. 26, 74-85 (1972).

TEMMINK, J.H.M., J.G. COLLARD, H. SPITS and E. ROOS:
A comparative study of fluor cytochemical detection
methods of Concanavalin A. binding sites on the cell
membrane.
Exp. Cell Res. 92, 307 (1975).

THOMAS, C. und G. KERSTING:
Zur Morphologie der durch Methylnitrosoharnstoff er-
zeugten Hirntumoren bei der Ratte.
Naturwissenschaften 51, 144-145 (1964).

THOMAS, C., J.L. SIERRA und G. KERSTING:
Hirntumoren bei Ratten nach oraler Gabe von N-Nitroso-
N-methylharnstoff.
Naturwissenschaften 54, 228-229 (1967).

THOMSON, D.M.P.:
Soluble tumour-specific antigen and its relationship
to tumour growth.
Int. J. Cancer 15, 1016-1029 (1975).

THUST, R.:
Karyotypveränderungen in Klonen eines N-Methylnitroso-
harnstoff induzierten empfindlichen Sarkoms des Rinder-
marks der Ratte in vitro.
Exp. Path. 5, 226-234 (1971).

THUST, R.:
Klone monstrozellulärer experimenteller Tumoren des
Zentralnervensystems des Hundes und der Ratte in vitro.
Exp. Path. 6, 158-166 (1972).

THUST, R. and R. WARZOK:

Comparative studies on the in vitro and in vivo morphology of clones of experimental CNS tumours in the rat.

Acta neuropath. 20, 248-257 (1972).

THUST, R., R. WARZOK und H. BATKA:

Die Morphologie experimenteller Tumoren des Nervensystems in vitro.

Arch Geschwulstforsch. 40, 300-307 (1972).

THUST, R. and R. WARZOK:

The morphology of experimental tumours of the nervous system. II. Intracerebral tumours in the rat.

Acta neuropath. 27, 25-32 (1974).

THUST, R.:

Morphologie und Zytogenetik experimenteller Tumoren des Nervensystems in vitro.

Promotionsschrift, Jena(1975).

THUST, R.:

Langzeitkulturen experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems als Modelle für neuroonkologische Forschungen.

Zbl. allg. Path. 120, 274-283 (1976).

TOH, B.H. and E.P.G. GULI:

In vitro immunoreactivity against ethylnitrosourea - induced tumours of the nervous system in the rat.

Experientia 30, 1472 (1974).

TORPIER, G. et L. MONTAGNIER:

Etude ultrastructurale de la distribution des récepteurs pour Concanavaline A à la surface des cellules normales et transformées par des virus oncogènes.

Int. J. Cancer 11, 604-615 (1973).

VLODAVSKY, I., M. INBAR and L. SACHS:

Membrane changes and adenosine triphosphate content in normal and malignant transformed cells.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1780-1784 (1973).

WALBORG, E.F., Jr., V.P. WRAY, D.F. SMITH and G. NERI:

Alteration of cell-surface glycoproteins during malignant transformation: receptors for the phytoagglutinins, Concanavalin A and wheat germ agglutinin.

In: Immunological aspects of Neoplasia, Baltimore.

The Williams and Wilkins Company 1975 pp. 123-147.

WALTHER, J.-U., S. STENGL-RUTKOWSKI and J.-D. MURKEN:

Observations with G-banding of human chromosomes.

Humangenetik 25, 49-51 (1974).

WECHSLER, W., P. KLEIHUES, S. MATSUMOTO, K.J. ZÜLCH,

S. IVANKOVIC, R. PREUSSMANN and D. DRUCKREY:

Pathology of experimental neurogenic tumors chemically induced during prenatal and postnatal life.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 360-408 (1969).

WECHSLER, W., S.E. PFEIFFER, J.A. SWENBERG and

A. KOESTNER:

S-100 protein in experimental rat tumors of the central and peripheral nervous system.

Naturwissenschaften 59, 370-371 (1972).

ZANKL, H.:

Persönliche Mitteilung (1977).

ZIMMERMANN, H.M.:

Nature of gliomas as revealed by animal experimentation.

Amer. J. Path. 31, 1-29 (1955).

ZIMMERMANN, H.M.:

The nature of experimental gliomas.

Clin. Neurosurg. 7, 247-260 (1961).

ZÜLCH, K.J.:

Biologie und Pathologie der Hirngeschwülste.

In: Olivecrona-Tönnis, Hdb. der Neurochirurgie

Ed. III. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.

Herrn Professor Dr. E. Dahme bin ich für die Möglichkeit, in seinem Hause diese Arbeit anzufertigen, zu großem Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. D. Stavrou für die Stellung des Themas, die mir jederzeit gewährte Hilfe und seine wertvollen Anregungen.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Dr. P. Bachmann, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, für seine stets freundlichen Ratschläge bei schwierigen Problemen der Zellzüchtung danken.

Herrn Professor Dr. D.O. Schmid, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, danke ich herzlich für die technische Hilfe bei der Durchführung des Concanavalin A-Agglutinationstestes.

Nicht zuletzt möchte ich an dieser Stelle nochmals Frau Dr. B. Schröder, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie, und Herrn Dr. A.P. Anzil, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, für die freundliche Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen danken; Herrn Dr. H. Zankl, Institut für Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, für die Auswertung der Chromosomenanalyse.

Für die technische Hilfe möchte ich Fräulein D. Wallmann meinen Dank aussprechen.

LEBENSIAUF

Am 28. 5. 1950 wurde ich als Tochter des Sicherheitsingenieurs Wilhelm Osterkamp und seiner Ehefrau Erika, geb. Glosemeyer, in München geboren.

Von September 1956 bis Februar 1957 besuchte ich die Volksschule Ottobrunn und dann bis 1960 die Volksschule Hohenbrunn - Riemerling; 1960 wechselte ich in das Mädchengymnasium der Armen Schulschwestern in München über, an dem ich 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium Chemie/Physik für das Lehramt. Im Januar 1970 bewarb ich mich für das Studium der Tiermedizin, zu dem ich für das Sommersemester 1970 die Zulassung erhielt.

Am 9. Mai 1975 bestand ich das Tierärztliche Staatsexamen. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich im Juli 1975.

Im Herbst 1974 begann ich am Institut für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät München mit der vorliegenden Arbeit.

